

# Massenspektrometrische Untersuchungen einzelner Pollenkörner

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*Doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau MSc. Franziska Lauer

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

---

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Janina Kneipp

2. PD Dr. Michael Weller

3. PD Dr. Franziska Emmerling

Tag der mündlichen Prüfung:

13.02.2019



Die vorliegende Arbeit entstand an der Bundesanstalt für  
Materialforschung und -prüfung (BAM)

# Massenspektrometrische Untersuchungen einzelner Pollenkörner

Franziska Lauer  
27.11.2018



---

## Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung im Fachbereich 1.3 Strukturanalytik im Rahmen einer Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin erstellt. Daher spreche ich der BAM, Herrn Prof. Dr. Ulrich Panne und meiner Abteilungsleiterin Frau PD Dr. Franziska Emmerling meinen herzlichen Dank aus, für die finanzielle Förderung meiner Promotion und die Möglichkeit meine Ergebnisse auf den unterschiedlichsten Konferenzen präsentieren zu dürfen.

Einen großen Dank richte ich an meine beiden Promotionsbetreuer Dr. Steffen Weidner und Prof. Dr. Janina Kneipp für die interessante Aufgabenstellung. Steffen danke ich für seine besonnene Art, seinen Ideenreichtum und sein Mitwirken bei vielen schriftlichen Ausarbeitungen. Für die intensive Betreuung und die Möglichkeit zur regelmäßigen Präsentation meiner Ergebnisse in ihrem Seminar bedanke ich mich besonders bei Prof. Dr. Janina Kneipp.

Ohne meine Arbeitskollegen aus der Abteilung 1.3, die Polymeranalytikerinnen Dr. Jana Falkenhagen, Rosemarie Laging, Karin Böttcher und Franziska Rudolph, der Mittagsrunde aus Doktoranden, der Werkstatt 1.3, der AK Kneipp und meine super lieben Bürokollegen Ruben Epping, Maria Baumann, Zengchao You und Phillip Scholz wäre diese Arbeit wesentlich langweiliger geworden, danke!

Zudem bedanke ich mich namentlich bei Herrn Dr. Thomas Dürbye und dem Botanischen Garten Berlin-Dahlem für die Erlaubnis und Hilfe beim Sammeln von Pollenproben.

Einen großen Beitrag zum Gelingen meiner Promotion haben im Bereich der multivariaten Statistik insbesondere Dr. Stephan Seifert und Sabrina Diehn geleistet. Ihnen bin ich sehr dankbar für die spannenden Diskussionen und Optionen zur Auswertung meiner Daten mit Matlab. Darüber hinaus danke ich Dr. Jan Gerretzen und Gerben Mooiweer für den Anstoß zum Programmieren einer graphischen Benutzeroberfläche und für ihre Tipps zu der „Magie dahinter“.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich der Firma Bruker Daltonik GmbH und dabei vor allem Volker Sauerland und Cesar Barahona, die mir die Chance gaben in Bremen an einem Autoflex Speed MALDI-TOF Imaging-Messungen an Pollenmischungen durchführen zu können.

In

einem

weiteren Teil meiner Arbeit hat Dr. Jürgen H. Gross im MS-Labor des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg dankenswerterweise DART-Messungen an Pollenproben für mich durchgeführt.

Sehr dankbar bin ich meinen Eltern Dr. Raimund und Dr. Anna-Maria Lauer für ihre Hingabe, ihr offenes Ohr und ihre Unterstützung in allen meinen Lebenslagen. Meinem Bruder und meinen Freunden danke ich für die schönen Aktivitäten und Erholungen am Wochenende in Hamburg. Zuletzt bleibt mir nur, dem lebenswertesten und entspanntesten Menschen meines Lebens zu danken, der mir meine Freiheiten und Eigenheiten lässt und mir sehr viel Geborgenheit schenkt.

Franziska Lauer  
Berlin, September 2018

---

## Zusammenfassung

Blütenstaub ist eine der Hauptursachen für allergische Erkrankungen des Menschen. Noch heutzutage erfolgt die Identifizierung von Pollen meist über aufwändige, mikroskopische Bestimmung der äußeren Morphologie der Pollenkörner, obwohl in den letzten Jahren alternative spektroskopische und spektrometrische Ansätze beschrieben wurden. Insbesondere die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit Massenspektrometrie (engl. *matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight*, MALDI-TOF) stellt eine geeignete Technik dar, um solch komplexe, biologische Proben zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit werden daher folgende Fragen untersucht. Wie lassen sich Pollenkörner insbesondere in geringen Mengen mit MALDI-TOF MS optimal messen? Wie lassen sich MS-Spektren unterschiedlicher Pollenproben effizient auswerten und voneinander unterscheiden? Funktioniert das auch in einer Mischung, die aus verschiedenen Pollenarten besteht?

Bei diesen MALDI-TOF MS-Analysen werden die Bestandteile detektiert, die zuvor durch die Matrixauftragung und/oder während der Laser-Desorption von der Oberfläche des Pollenkorns abgelöst werden. Pollen bestehen, wie jede biologische Struktur, aus spezifische Proteine, Peptide, Lipide und Kohlenhydrate, welche im Massenspektrum charakteristische Signalmuster ergeben. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Verwendung eines leitfähigen Klebebandes zur Probenpräparation sowohl die Fixierung der Pollenkörner als auch die Extraktion der Analyten aus diesen verbessert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass sich mit diesem massenspektrometrischen Ansatz Pollen verschiedener Pflanzenarten über den Vergleich von Peakmustern differenzieren lassen. Dazu ist es nicht unbedingt notwendig, jedem Signal die Struktur der dazugehörigen chemischen Verbindung zuzuordnen. Insbesondere in Spektren ähnlicher Pollenarten sind die Signalunterschiede mit bloßem Auge häufig gar nicht sichtbar. Zur Beurteilung der spektralen Muster wurden in dieser Arbeit daher multivariate, statistische Verfahren, speziell die Hauptkomponentenanalyse verwendet. Diese hebt Unterschiede in den Datensätzen hervor und ermöglicht eine varianzgewichtete Darstellung und verbesserte Klassifizierung. Zur effizienten multivarianten Analyse wurde dieses Verfahren in eine graphische Benutzeroberfläche eingebunden.

Neben der individuellen Charakterisierung einzelner Pollenproben liegt eine weitere Herausforderung in der massenspektrometrischen Analyse von Pollenkornmischungen, da es durch Vermischungs- und Suppressionseffekte zur Diskriminierung einzelner, möglicherweise charakteristischer MS-Peaks kommen kann. Deshalb wurde in dieser Arbeit die bildgebende MALDI Massenspektrometrie (engl. MALDI MS Imaging) angewendet, die lateral aufgelöste Spektren liefert. Für die Auswertung der Imaging-Datensätze wurden weitere multivariate Verfahren angewendet, untersucht und beurteilt. So konnten in einem Modellsystem einzelne Pollenkörner unterschiedlicher Arten nachgewiesen und ihren ursprünglichen Positionen in der Probe zugeordnet werden.

Der im Rahmen der Arbeit vorgestellte Ansatz stellt eine neue, zuverlässige Methode zur Pollenbestimmung dar, die nicht auf der individuellen, visuellen Beurteilung, sondern auf einer spektrometrisch-analytischen Basis beruht.



---

## Abstract

Pollen represent one of the major causes for allergies in humans. Even today, their conventional identification is performed by time-consuming microscopic determination of pollen grain morphology, although alternative spectroscopic and spectrometric approaches have already been described. Especially matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight (MALDI-TOF) is a suitable technique to characterize such complex biological samples.

Therefore, the following questions are investigated in this work. How can pollen grains be optimally measured with MALDI-TOF MS, especially in small quantities? How can MS spectra of different pollen samples be efficiently evaluated and differentiated from each other? Does this also work in a mixture consisting of different pollen species?

In pollen analyses, MALDI-TOF MS detects components that are extracted from the grain surface by the matrix solution and during laser desorption. Like any biological structure, pollen grains contain specific proteins, peptides, lipids and carbohydrates that produce characteristic signal patterns in the mass spectrum. The sample preparation applied in this work showed that the use of a conductive adhesive tape improves both the fixation of the pollen grains and the extraction of the analytes from them.

The results in this work prove that with this MALDI-TOF MS approach, pollen of different plant species can be differentiated by comparing their respective spectral patterns. Therefore, it is not necessary to assign the structure of each chemical compound to every signal. Especially in spectra of similar pollen species the signal differences are often not visible by eye. For the evaluation of such spectral patterns multivariate statistical methods, and in this work especially principal component analysis (PCA), are needed. PCA highlights differences in data sets and enables variance-weighting and improved classification. For efficient multivariate analysis, this method was integrated into a graphical user interface.

In addition to the individual characterization of pollen samples, the mass spectrometric analysis of pollen grain mixtures posed a further challenge, since mixing and suppression effects can lead to discrimination of individual, possibly characteristic MS-peaks. For this purpose, the MALDI MS Imaging technique was applied, which provides laterally resolved spectra of a selected raster size. For the evaluation of such imaging data sets, further multivariate methods were applied investigated, and evaluated. Thereby, in a model system individual pollen grains of different species could be identified and assigned their original position in the sample.

The presented approach represents a new, reliable method for pollen determination, based on spectrometric-analytical basis rather than an individual visual assessment.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand der Forschung</b>	<b>1</b>
2.1 Typisierung biologischer Proben mit spektroskopischen und spektrometrischen Techniken	2
2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie	6
2.2.1 Desorption und Ionisationsprozess – Rolle der Matrix	6
2.2.2 Probenträger und Probenpräparation	7
2.2.3 Messgerätaufbau des MALDI-TOF Massenspektrometers	9
2.3 MALDI-TOF Imaging MS	10
2.4 Pollenanalyse	12
2.5 Musterbasierte Datenanalyse von Massenspektren	15
2.5.1 Vorbehandlung der Spektren	16
2.5.2 Klassifizierung und Identifizierung von Datensätzen	17
2.5.3 Graphische Benutzeroberfläche	19
<b>3. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
4.1 Pollenproben	22
4.2 Verwendete Chemikalien	22
4.3 Probenpräparation	23
4.3.1 Probenauftragung	23
4.3.2 Analytextraktion	23
4.3.3 Matrixauftragung	23
4.4 Messgeräte und Einstellungen	26
4.5 MALDI-TOF Imaging	26
4.6 Spektrale Vorbehandlung der Messergebnisse	27
4.6.1 Datenreduktion	27
4.6.2 Basislinienkorrektur	27

4.6.3 Normierung .....	28
4.7 Auswertung .....	28
4.7.1 Silhouetten-Koeffizient .....	28
4.7.2 DUNN-Index .....	29
4.7.3 Graphische Benutzeroberfläche.....	29
4.7.4 Nicht-negative Matrix-Faktorisierung.....	29
4.7.5 Hierarchische Clusteranalyse .....	30
4.7.6 Hauptkomponentenanalyse .....	30
<b>5. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>31</b>
5.1 MALDI-TOF MS von einzelnen Pollenproben .....	31
5.1.1 Optimierung instrumenteller Parameter.....	32
5.1.2 Optimierung experimenteller Parameter.....	43
5.1.3 Vereinfachte Auswertung mithilfe einer grafischen Benutzeroberfläche .....	58
5.2 MALDI-TOF MS von Mischungen von Pollenkörnern.....	65
5.2.1 Einfluss der Anzahl von Pollenkörnern einer Spezies .....	65
5.2.2 Einfluss der Anzahl von Pollenkörnern verschiedener Spezies in Mischungen ....	66
5.2.3 Multivariate Auswertung des simulierten Mischdreiecks.....	69
5.2.4 Fazit.....	72
5.3 MALDI-TOF Imaging von Mischungen von Pollen .....	72
5.3.1 Variation der Matrixauftragung.....	72
5.3.2 MALDI-TOF MS Imaging.....	75
5.3.3 Identifizierung von Pollenkörnern in Mischungen anhand unabhängiger Referenzproben.....	89
5.3.4 Fazit.....	91
5.4 DART-Messungen von einzelnen Pollenproben.....	91
5.4.1 Spektrale Vorbehandlung der DART-Spektren.....	92
5.4.2 Hauptkomponentenanalyse der DART-Spektren .....	95
5.4.3 Fazit.....	97
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>98</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>103</b>

7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	103
7.2 Abbildungsverzeichnis .....	106
7.3 Tabellenverzeichnis .....	111
7.4 Literaturverzeichnis .....	112
7.5 Publikationsverzeichnis .....	134
7.5.1 Veröffentlichungen .....	134
7.5.2 Vorträge .....	134
7.5.3 Poster .....	134
<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>136</b>



# 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, eine vereinfachte, schnelle und zuverlässige Methode zu entwickeln, mit der einzelne Pollenkörner in künstlichen oder realen Mischungen charakterisiert und taxonomisch zugeordnet werden können. Da Pollen eine der Hauptursachen für allergische Erkrankungen des Menschen darstellen, ist ein Informations- und Warnsystem zum Pollenflug ein wichtiger Aspekt in der Wettervorhersage. [1] Noch heutzutage erfolgt die dafür nötige Pollenkornidentifizierung über aufwändige, mikroskopische Bestimmung ihrer äußeren Morphologie, obwohl alternative spektroskopische und spektrometrische Ansätze beschrieben wurden. [2-4] Insbesondere Verfahren der massenspektrometrischen Untersuchungen von Pollen mit geeigneter statistischer Auswertung bieten einen interessanten Ansatz zur Identifizierung und taxonomischen Einordnung von Pflanzen. [5] Dabei sind die genauen chemischen Strukturen der untersuchten Spezies von untergeordnetem Interesse, da die Typisierung anhand gattungs- oder artspezifischer Muster in den Massenspektren erfolgt. So kommt multivariaten Verfahren zur Mustererkennung und Differenzierung für eine effiziente Auswertung eine wichtige Rolle zu. [3, 5]

Daher wird im folgenden Kapitel zuerst ein Überblick zum jeweiligen Stand der Forschung hinsichtlich der Typisierung von biologischen Proben, der MALDI-TOF Massenspektrometrie und deren bildgebenden Variante, der Pollen- und Datenanalyse gegeben. Darauf aufbauend werden Zielsetzung der Arbeit, Material und Methoden beschrieben und die Ergebnisse diskutiert, die zur Optimierung und Weiterentwicklung bestehender Verfahren der Pollenanalyse beitragen. Nach der Zusammenfassung der Ergebnisse werden in einem Ausblick konkrete Vorschläge gemacht, die dazu führen sollen, das Pollen-Screening auf massenspektrometrischer Basis zu gestalten.

## 2. Stand der Forschung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Methoden und Messtechniken angewendet. Im folgenden Kapitel sollen die angewendeten analytischen und multivariaten Verfahren kurz vorgestellt und Vor- und Nachteile diskutiert werden. Dazu wird zunächst betrachtet, welche Methoden bereits zur Untersuchung von Umweltproben, z.B. Bioaerosolen, in der Literatur beschrieben wurden. In den folgenden Abschnitten wird dann speziell auf die MALDI-TOF Massenspektrometrie sowie den derzeitigen Stand der Pollenuntersuchung eingegangen, um am Ende verschiedene Verfahren der Datenanalyse zu beschreiben und zu diskutieren.

## 2.1 Typisierung biologischer Proben mit spektroskopischen und spektrometrischen Techniken

Biochemische Untersuchungen an Umweltproben werden häufig mit dem Ziel der Typisierung, d.h. einer Charakterisierung und anschließenden Unterteilung vorgenommen. Dies kann beispielsweise die Biotypisierung von Bakterien, die Analyse der Erscheinungsabbildung von Organismen (Phänotypisierung) oder das Sammeln von Merkmalen zur Identifikation (engl. *profiling*) sein. Jede biologische Struktur weist eine charakteristische Zusammensetzung ihrer Bestandteile, in der Regel bestehend aus Proteinen, Peptiden, Lipiden, Kohlenhydraten etc., auf. Die Untersuchung derartiger Stoffklassen zum Zwecke des Profiling wird in der Analytik als Messen eines chemischen Fingerabdrucks beschrieben. So lassen sich zum Beispiel phylogenetische oder taxonomische Analysen von Tieren, Bakterien [6-12] oder Pflanzen [13, 14] und deren Pollenkörnern [3] durchführen. Um eine solche Typisierung vorzunehmen, existiert eine Vielzahl von analytischen Techniken.

### **Schwingungsspektroskopie (IR, Raman, SERS)**

Verfahren der Schwingungsspektroskopie, wie die Raman-Spektroskopie, die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) oder die Infrarotspektroskopie (IR) stellen eine Möglichkeit dar, biologische Proben weitgehend zerstörungsfrei zu typisieren.

Als Raman-Streuung wird ein unelastisches Streuphänomen bezeichnet, in dem Photonen aus einer Laserquelle mit den Molekülschwingungen einer Probe interagieren und gestreute Photonen mit einer veränderten Energie erzeugen. [2, 15, 16] Die Energiedifferenz entspricht der Energie der Molekülschwingung, mit der die Photonen interagiert haben. [2, 15, 16] Die gemessenen Spektren enthalten so Schwingungsinformationen, welche einen molekularen Fingerabdruck der gemessenen Materialien bieten. [2, 15, 16] Die Raman-Spektroskopie wurde bereits bei einer Vielzahl von komplexen biologischen Materialien, wie Mikroorganismen [17-20], Pilzen und Pflanzen [21-23], tierischen Zellen [24, 25], Lebensmitteln [26-28] oder Pollen [2, 29, 30] angewendet. Durch Raman-Spektroskopie an Pollenkörnern lassen sich chemische Bestandteile der Pollenkörner, wie beispielsweise Proteine, Polysaccharide wie z.B. Pektin und Stärke, Lipide und Karotinoide charakterisiert. [2] Während Raman-Messungen an Pollenkörnern bei verschiedenen sichtbaren und nah-infraroten Anregungswellenlängen einen hohen Floreszenzuntergrund in den Spektren zeigten, ließ sich dieses Problem durch die Verwendung von Silbernanopartikeln in Experimenten mit der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) deutlich



reduzieren. [29] So konnte mit geringerer Bestrahlungsstärke und kürzeren Akkumulationszeiten eine spektrale Verbesserung in der Messung von Pollenextrakten um den Faktor 4-6 erreicht werden. [29] SERS-Signale haben allerdings den Nachteil, dass sie lokal auf die unmittelbare Nähe der Nanopartikel beschränkt sind und überdies hohe Varianzen aufweisen. [29] Darüber hinaus können Raman- und SERS-Spektren der gleichen Probe voneinander abweichen, da möglicherweise eine direkte Wechselwirkung einiger Probenbestandteile mit dem Metall der Nanopartikel besteht bzw. die großen Feldgradienten der lokalen optischen Felder der Silbernanoartikel diese Abweichung erzeugen können. [29] Die Durchführung der SERS-Messungen an Pollenextrakten ermöglichte eine klare Charakterisierung und Identifizierung unterschiedlicher Pflanzenarten. [30]

Im Gegensatz zur Raman-Spektroskopie beruht die Fourier-Transformations-Infrarot-(FT-IR)-Spektroskopie auf der Absorption, Transmission oder Reflexion von Infrarotlicht. [4] Bei diesem Verfahren wird das Infrarotlicht von einer Probe bei verschiedenen Frequenzen absorbiert, die den Schwingungsfrequenzen der Bindungen in der Probe entsprechen. [4] Im FT-IR-Spektrometer können Spektren von biologischen Proben durch einfache Reflexion [4, 31, 32] multi-Reflexionen [33], abgeschwächte Totalreflexion (engl. *attenuated total reflection*, ATR), diffuse Reflexion oder mit Transmission aufgenommen werden. Mit FT-IR-Spektroskopie lassen sich Bakterien klassifizieren [34], wurden Pilze und Sporen untersucht [35, 36] und Pflanzen anhand von Blattanalysen charakterisiert [37-39]. Beispielsweise konnten bestimmte Antioxidantien und andere Bestandteile in Thymian oder Basilikum gefunden werden [40, 41] und Erdbeersorten [42] bzw. verschiedene Bocksdornsorten differenziert werden [43]. Im Bereich der Pollenanalyse sind mehrere Veröffentlichungen bekannt, in denen FT-IR-Spektroskopie zur Messung einzelner [31, 36, 44-46] und mehrerer Pollenkörner [47-53] verwendet wurde. Ein Beispiel beschreibt, wie dünne Schichten von Pollenfragmenten von Pflanzen der Gattung *Fagaceae* und *Betulaceae* mit FT-IR-Spektroskopie gemessen. [32] Dabei zeigten sich zwischenjährliche und standortbezogene Unterschiede in den Spektren der Pollenfragmente. [32]

Der Literaturüberblick zeigt, dass sowohl Raman- als auch FT-IR-Spektroskopie, Vorteile und Grenzen aufweisen. In Kombination beider oder weiterer, z.B. massenspektrometrischer Techniken ergibt sich jedoch ein leistungsstarkes Analysewerkzeug. Dies belegt u.a. kombinierte Messungen mit GC-MS, FT-IR- und Raman-Spektroskopie von Lippenblütengewächsen [54] und Birken [55].

### Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung von Verbindungen anhand der Molekül- bzw. Atommassen. Dabei wird eine Probe in der sogenannten Quelle des Massenspektrometers ionisiert, im Analysator nach ihrer Masse getrennt und im Detektor nachgewiesen. [56] Die Darstellung der Analyse erfolgt in einem Massenspektrum, in dem die Häufigkeit der nachgewiesenen Molekül-Ionen (Signalintensität) gegen die Masse aufgetragen wird. [56] Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Massenspektrometern mit unterschiedlichen Ionisierungsarten wie chemisch, thermisch oder radiologisch Verfahren, unterschiedlichen Massenanalysatoren wie magnetische Sektorfelder-, Quadrupole-, Flugzeit-, Ionenfallen- oder Zyklotron-Resonanz-Massenanalysatoren und Detektoren wie Elektronenmultiplier, Kanalelektronenvervielfacher oder Mikrokanalplatten. [57] Dabei stellt die MALDI-TOF MS im Vergleich zu anderen Verfahren eine überaus vorteilhafte Technik dar um komplexe biologische Materialien in einem breiten Molmassenbereich zu untersuchen. [58] Von Vorteil ist insbesondere, dass Analyten in einem theoretisch unbegrenzten  $m/z$  Bereich und, was meist noch interessanter ist, unzersetzt messbar sind. [58]

Bereits in den neunziger Jahren erschienen die ersten Veröffentlichungen zu MALDI-Untersuchungen an intakten Zellen oder deren Extrakten. [59] Claydon *et al.* beschreiben beispielsweise 1996 die Analyse von einzelnen Bakterien aus Mischkulturen. [59] MALDI-TOF MS von unterschiedlichen Bakterien [60-66] und Viren [67, 68] sind mittlerweile Routineuntersuchungen, insbesondere zum Nachweis von Krankenhauskeimen [69, 70] und stellen eine schnelle Alternative zum teilweise mehrtägigen Anzüchten von Bakterienkulturen dar. Die Literaturrecherche auf der Web of Science-Plattform zu „MALDI“ und „bacteria“ ergab über 2900 Treffer. Weit ungewöhnlichere Untersuchungsobjekte sind jedoch intakte Organismen, wie Fische [71, 72], Shrimps [73-75], Fliegen und Mücken [76-78], Zecken [79, 80] oder Milben [81], die mit MALDI-TOF MS als Ganzes untersucht wurden. Darüber hinaus wurden hier verschiedene Verfahren zur Probenvorbereitung von Organismen, wie deren Zermahlen [81], Suspensions-/ Extraktionsmethoden [79] oder die Präparation einzelner Organe [77] beschrieben. Von biochemischen Interesse sind überdies luftübertragbare, biologische Partikel - wie Sporen [82-86] oder Pollenkörner [3, 5, 87-89] - da diese ein hohes pathogenes bzw. allergenes Potential aufweisen.

Neben der MALDI-TOF MS gibt es andere massenspektrometrische Verfahren, die zur Typisierung von komplexen biologischen Proben zum Einsatz kommen, wie die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), die Desorption Electrospray Ionisation (DESI) und die Direct Analysis in Real Time (DART).

Ein dem MALDI-Prinzip ähnliches Verfahren ist die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS). Hier wird die Oberfläche eines Festkörpers mit einem Strahl von Primär-Ionen hoher Energie beschossen, was dazu führt, dass aus der Probe Sekundär-Ionen emittiert und analysiert werden. [90] So wurde TOF-SIMS beispielsweise eingesetzt, um das Insektizid Lindan in Schimmelpilzen nachzuweisen. [90] Ein weiteres Beispiel stellt die Untersuchung der Entwicklung von Sporen von Stäbchenbakterien in verschiedenen Kulturmedien dar. [91] TOF-SIMS bietet ferner eine variable Analyseplattform, die von der Charakterisierung von Bakterienkolonien [92] bis hin zur Analyse von Olivenscheiben [93] reicht. Im botanischen Bereich erfolgte der Einsatz von SIMS unter anderem zur Unterscheidung von Splint- und Kernholz der Hinoki-Scheinzypresse (*Chamaecyparis obtuse*) [94], oder für ein Lignin-Profilung im Xylem des Kleinblütigen Ahorn (*Acer micranthum*) und der westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*) [95, 96]. Im Gegensatz dazu finden sich nur wenige Beispiele zur botanischen Charakterisierung mit Hilfe der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie Kopplung (LC-MS). In einem Beispiel untersuchte Mc Dougall 2011 den Einfluss von Genotypus und Temperatur auf die Polyphenolzusammensetzung in Moltebeeren. [97]

Vielfältiger sind dagegen Untersuchungen, die mit Desorption Electrospray Ionisation (DESI) oder Direct Analysis in Real Time (DART) erfolgen. Da beide Techniken zu den Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden gehören, verfügen sie über ein hohes Potenzial für die Hochdurchsatzanalytik. [98-100] Der Vorteil dabei ist, dass die zu messenden Proben ohne größere Vorbereitung in der Ionisationszone des Interfaces positioniert werden können. [98-100] Der Nachweis von Verbindungen gelingt dabei allerdings nur bei schwach an Oberflächen gebundenen Analyten. Ein Beispiel zum Einsatz von DESI stellt die Unterscheidung von intakten Bakterien dar. [98] DESI wurde ferner zur Untersuchung der Allelopathie von tropischen Meeresalgen [101, 102] sowie zur Lokalisierung von Alkaloiden in Blättern [103] oder für die Arsenbestimmung in Farnblättern verwendet [104]. Während die DESI Technik unter anderem als bildgebendes Verfahren eingesetzt wird, stellt DART eine häufig genutzte Technik für schnelle Analysen, wie z.B. dem '*fatty acid profiling*' von Bakterien [99], zur Unterscheidung von Salbei [105], bei der Identifikation von Stechapfelsorten [106] oder zur Messung von Cannabinoiden in Kräutern [100, 107] dar. Der Nachweis einer Verbindung hängt jedoch stark von der Beschaffenheit der untersuchten Oberfläche und von der Tiefe des Analyten in der Probe ab. Zudem ist der Massenbereich, der mit DART und DESI untersucht werden kann, auf Grund der Ionisierungsart auf relativ niedermolekulare Ionen unter  $m/z$  2500 begrenzt. [57]

Auf Grund der Vorteile, die die MALDI-TOF Massenspektrometrie gegenüber den anderen MS Methoden bietet, wie der Messbarkeit hoher Massenbereiche, keine Fragmentierung und Einfachionisation der Analyten stand die systematische Untersuchung von Pollenkörnern mit dieser MS-Technik im Vordergrund dieser Arbeit.

## 2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Schon bald nach der Entwicklung des ersten Festkörperlaser von Theodore Maiman um 1960 wurden solche Laser in der Massenspektrometrie zur Ionisation und Desorption von Analyten eingesetzt. [108, 109] Auf Grund der hohen Intensität der Laser fragmentiert sie große Moleküle nahezu vollständig, sodass lediglich niedermolekulare, lichtabsorbierende und organische Moleküle messbar waren. [110, 111] Eine Weiterentwicklung dieser Kombination beschrieben Kaufmann und Hillenkamp 1975 mit der Laser-Mikrosonden-Massenspektrometrie (LMMS) bzw. dem Laser-Microprobe-Mass-Analyzer (LAMMA). [58, 112, 113] Damit konnten erstmals organische Verbindungen mit Massen bis zu  $m/z$  10000 untersucht werden. [58, 112, 113]

Die ersten Flugzeit-(engl. *time of flight*, TOF)-Massenspektrometer, meist verwendet in der GC-MS-Kopplung, gab es bereits Mitte der 1950er Jahre. [114, 115] Die TOF-Massenspektrometer etablierten sich jedoch erst Ende der 1980er Jahre, da sie erst in Kombination der gepulsten Ionisation eine neue, wichtige Bedeutung bekamen. [116, 117] Hier leisteten wiederum Hillenkamp und Karas Pionierarbeit, als sie 1988 unter Zuhilfenahme von niedermolekularer Nicotinsäure erstmals Lysozym,  $\beta$ -Lactoglobulin, Schweinetrypsin und Albumine messen konnten. [118] Zur gleichen Zeit untersuchte Koichi Tanaka (Shimadzu) die Wirkung eines ultrafein gemahlten Cobaltmetallpulvers, das in Glycerol dispergiert wurde, als Hilfsmittel zur Messung von Lysozym, Chymotrypsinogen, Polypropylenglycol (PPG) und Polyethylenglycol (PEG). [119] In allen Fällen war es nur mit Matrix möglich intakt Analyten zu messen. Im Jahre 2002 wurde der Nobelpreis für Chemie „für ihre Entwicklung von weichen Desorption/Ionisations-Methoden zur massenspektrometrischen Analyse von biologischen Makromolekülen“ nicht ganz unumstritten ausschließlich an Tanaka und J. B. Fenn für die Beiträge zur Entwicklung einer weiteren ‚weichen‘ Methode – dem ESI verliehen. [120]

### 2.2.1 Desorption und Ionisationsprozess – Rolle der Matrix

In der Massenspektrometrie wird daher zwischen ‚weichen‘ und ‚harten‘ Ionisationsmethoden unterschieden. [121] Harte Ionisationsmethoden bieten durch die Fragmentierung eine

Möglichkeit zur Strukturaufklärung, während die Gesamtmasse eines Analyten meist nicht erhältlich ist. [57] Diese können nur mit weichen Ionisationsmethoden gemessen werden. Um jedoch komplette Molmassen größerer Biomoleküle zu analysieren, bedarf es eines Tricks, bei dem der Analyt in eine niedermolekulare Trägersubstanz (Matrix) eingebettet wird. [118, 122, 123] Bei der Laserbestrahlung dieser Mischung aus Matrix und Analyten nehmen die kleinen organischen Matrixmoleküle die Energie auf, desorbieren mit den eingeschlossenen Analyten und führen in der Gasphase zu einer sekundären Ionisation ebendieser Analyten. [124-126] Dieser Energieübertrag erfolgt primär ohne Fragmentierung. [118, 122, 127, 128] Die zur sekundären Ionisation dienenden Matrixverbindungen sind häufig niedermolekulare, leicht saure, organische Moleküle. [129] Deren entscheidende Eigenschaft ist die starke Absorption des Lichts bei der gewünschten Laserlichtwellenlänge. [129] Dies ist die Voraussetzung für eine effiziente Energieaufnahme, die zur Desorption und Ionisation notwendig ist. [118, 122] Zudem verdünnt und isoliert die Matrixlösung die einzelnen Analytmoleküle. [129] Wie beschrieben war die Nikotinsäure die erste organische Matrixverbindung zur UV-MALDI-Untersuchung von Peptiden und Proteinen. Mittlerweile sind ca. 100 weitere Substanzen hinzugekommen. [130] Je nachdem welche Analytstoffklassen das Ziel der Untersuchung sind, werden die in Tabelle 2-1 vorgestellten Matrices empfohlen. Darüber hinaus sind die Lösungsmittel, Mischverhältnisse und Konzentration des Analyten selbst von Bedeutung für ein aussagekräftiges MALDI-Massenspektrum. [131]

Tabelle 2-1: Übersicht über Einsatzgebiet, Name und Abkürzung möglicher MALDI-Matrices.

<b>Einsatzgebiet</b>	<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>
Oligosaccharide & Lipide*	3-Aminochinolin	3-AQ
	2,5-Dihydroxybenzoesäure, Gentisinsäure	DHB
Peptide/ Proteine <sup>+</sup>	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure	4-HCCA
	Sinapinsäure	SA
	2-(4-Hydroxyphenyl-azo)benzoesäure	HABA
	3-(Indol-3-yl)acrylsäure	IAA
Synthetische Polymere <sup>o</sup>	2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB
	Trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile	DCTB
	1,8-Dihydroxy-10H-anthracen-9-on	Dithranol
	seltener: HABA, IAA	

\*[132, 133] <sup>+</sup>[134] <sup>o</sup>[135]

### 2.2.2 Probenträger und Probenpräparation

Die Art der Probenpräparation ist ein wesentlicher Parameter für die Qualität eines MALDI-Massenspektrums. [131] Der Standard-Probenträger im MALDI-TOF Massenspektrometer

besteht aus einer Edelstahlplatte, die auf dem Format einer 384 Mikrotiterplatte basiert. [136, 137] Ein häufig zu beobachtendes Phänomen beim Verdunsten von Tropfen ist die Bildung eines inhomogenen Probenpunkts, auch Ringeffekt genannt. [136, 137] Eine Verbesserung der Homogenität des Messpunktes bei Anwendung von flüssigen Extraktionsmitteln und Matrixlösungen bietet ein Metallprobenträger mit einer speziellen hydrophoben Beschichtung (AnchorChip). [138, 139] Bei diesem werden die Tropfen beim Verdunsten auf einen nur wenige 100 µm großen unbeschichteten Punkt aufkonzentriert. [138, 139] Andere Möglichkeiten zur Vermeidung der Ausbildung von Ringen, wie ionische Flüssigkeiten oder höhere Matrixkonzentrationen, wurden in einer Dissertation von S. Gabriel an der BAM untersucht. [140] In biochemischen Analysen werden häufig Glasobjektträger verwendet, die für die Anwendung im MALDI-TOF Massenspektrometer mit einer leitfähigen Indiumzinnoxid- (engl. *indium tin oxide*, ITO)-Beschichtung versehen sind. Diese werden gleichzeitig für die optische Mikroskopie und, wie im nächsten Kapitel beschrieben, für die bildgebende MS verwendet.

Einen alternativen Ansatz bildete die Verwendung von leitfähigem doppelseitigen Klebeband (engl. *conductive tape*, CT), das von verschiedenen Herstellern insbesondere für die SEM- (engl. *scanning electron microscope*)-Anwendung angeboten wird. [81, 141, 142] Dabei liegt die Höhe der Probe auf Grund des zusätzlichen Klebebands allerdings nicht mehr exakt im Fokuspunkt des Lasers, was die Kalibrierung leicht verändert. [81] Leitfähiges Klebeband wurde im Zusammenhang mit der MALDI-TOF MS bereits für die Analyse von Methamphetamin im Haar verwendet. [141] Von einer anderen Anwendung berichten Kajiwara *et al.*, die Spinnenmilben auf einem doppelseitigen Kohlenstoffband fixiert und mit MALDI-TOF MS analysiert haben. [81] Kuwayama *et al.* belegten, dass das leitfähige Klebeband für MALDI-TOF Imaging-Analysen von Pflanzenteilen geeignet ist. [142]

In der Präparation gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, Analyt- und Matrixsubstanzen auf diese Träger aufzutragen. Vier Arten der Probenpräparation sind in Abb. 2-1 genauer skizziert. Die erste, häufig angewendete Methode wird als Dried-Droplet-Präparation bezeichnet. [136, 137, 143] Dabei werden Matrix und Probenlösung gemischt und auf den Probenträger getropft. [136, 137, 143] Bei der langsamen Verdunstung entstehen jedoch größere Kristalle und eine Aufkonzentration in der Randregion des Tropfens durch Ringbildung. [140, 144-146] Durch sukzessive Auftragung von Matrix- und Analytlösungen werden sogenannte Thin-Layer- oder Sandwich-Präparationen

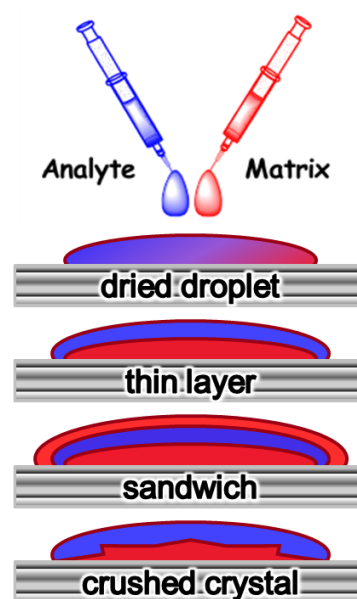


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung von vier Arten der Probenpräparation.

erzeugt. [147] Weitere Alternativen stellen das Auftragen der Matrixsubstanz durch Sieben (engl. *crushed crystal*), Sprühen bzw. Sublimieren der Matrixlösung dar. [140, 148-151]

### 2.2.3 Messgerätaufbau des MALDI-TOF Massenspektrometers

#### **Laser**

Der Laser im Massenspektrometer ist eine intrinsisch gepulste Lichtquelle, die Ionen erzeugt. [152-155] Prinzipiell können sowohl Kationen als auch Anionen erzeugt werden. [152-155] Die Mehrzahl der Geräte verwendet heutzutage Festkörperlaser z.B. einen 355 nm Nd:YAG-Laser. Die Verwendung von IR-Lasern wie einem Er:YAG-Laser (2,94  $\mu\text{m}$ ) ist dagegen weit weniger verbreitet. [152-155]

Die typische Pulsdauer eines UV-Lasers beträgt 3-10 ns. [156] Die Frequenzen liegen derzeit bei bis zu 10000 Hz, d.h. 10000 Spektren pro Sekunde. Nach jedem Laserpuls wird innerhalb weniger Mikrosekunden ein Einzelpuls-Spektrum erzeugt. [157] Diese Spektren weisen jedoch meist niedrige Signal-Rausch-Verhältnisse auf, sodass in der Regel 50-500 Einzelpulsspektren zu einem Summenspektrum akkumuliert werden. [157] Insbesondere gleicht die Akkumulation der Spektren eine inhomogene Analytverteilungen in der Matrix aus. Zur Vermeidung unerwünschter Fragmentierung von labilen Proben gibt es die Möglichkeit zur Regulierung der Laserintensität mittels Strahlabschwächer. [57] Dies kann mit Absorptionsfiltern oder speziellen Spiegelsystemen erfolgen. [57] Von entscheidender Bedeutung ist darüber hinaus die Fläche des Laserpunkts, da über diesen Parameter die Menge an abgetragenen Material gesteuert werden kann. Die geringe Punktgröße eines Nd:YAG-Lasers kann durch Einbau eines Strahlenmodulators optimiert werden. [158] Das Strahlprofil des Lasers wird so zu einem diffusen Mehrpunktmuster vergrößert – Bruker nennt diese Technik Smartbeam<sup>TM</sup>. [158]

#### **Flugzeit-Massenanalysator**

Die während des Desorptions- und Ionisationsprozesses gebildeten Analytionen werden durch eine Potentialdifferenz zwischen einer geerdeten Gegenelektrode (engl. *ion source 2*) und dem Probenträger (engl. *ion source 1*) beschleunigt und in den Massenanalysator überführt. [58, 159] Beim Übertritt in den Flugzeitanalysator besitzen die erzeugten Ionen die gleiche kinetische Energie. [58, 159] Während der sich anschließenden potentialfreien Driftstrecke im Vakuum, werden die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/z$  getrennt. [160] Es gilt für die Flugzeit ( $t$ ), je nach der Ladung der Ionen, d.h. größtenteils einfach, seltener doppelt geladen, die im folgenden dargestellte Gleichung (1). [57]

$$t = \frac{s}{\sqrt{2eU}} * \sqrt{\frac{m_i}{z}} \quad \text{Gleichung 1}$$

t = Flugzeit, s = Strecke, U = Beschleunigungsspannung, e = Elementarladung, m = Masse, z = Ladung

Die Länge des Analysators kann durch eine geeignete Geometrie wie einen Reflektor oder Spiral-TOF vergrößert werden. [58, 156, 161, 162] Dies führt zu einer Erhöhung der spektrometrischen Auflösung, aber zu einer Verringerung der Empfindlichkeit, da ein Teil der Ionen durch metastabilen Zerfall während der Flugzeit fragmentiert. [58, 156, 161, 162]

#### **Mikrokanalplatten-Detektor**

Die im Massenspektrometer aufgetrennten positiven oder negativen Ionen treffen am Ende der Flugstrecke auf den Detektor, meist ein sogenannter Mikrokanalplatten-Detektor (engl. *multi-channel plate*, MCP). [163, 164] Diesem Array aus Elektronenvervielfacher-Kanälen erzeugt für alle in einem bestimmten Zeitintervall auftreffenden Ionen ein Summensignal. [163, 164] Jedoch können höhere Massen leicht diskriminiert/supprimiert werden, da aufgrund einer breiten Analytdispersität eine Sättigung des Detektors eintritt. [165-167] Darüber hinaus wird durch die Anwesenheit großer Mengen an Matrix im niedermolekularen Bereich des Spektrums häufig ein hohes chemisches Rauschen durch Matrixcluster beobachtet, das durch geeignete Techniken wie dem engl. *ion gating* oder *ion deflection* unterdrückt werden kann. [167, 168] Aus diesem Grund ist das Einsatzgebiet der MALDI-TOF MS Technik häufig auf Massenbereiche limitiert, die über  $m/z$  800 liegen.

## 2.3 MALDI-TOF Imaging MS

Die zweidimensionale Variante einer MALDI-TOF MS Messung wird durch die Analyse bestimmter Ionen und deren Intensitätsverteilung in lateral aufgenommenen Spektren erreicht. [169, 170] Diese bildgebende Massenspektrometrie (engl. *imaging MS*, MSI) beschrieb im MALDI-Verfahren erstmals Caprioli, der Ionenbilder von gedruckten Coomassie-Brillant-Blau aufnahm und nachfolgend Gewebeschnitte von Bauchspeicheldrüse und Hirnanhangsdrüsen von Ratten untersuchte. [169] Bei medizinischen MALDI-TOF MSI-Anwendungen können beispielsweise das Vorhandensein, die Lage und Verteilung sowie die Intensität von bestimmten biochemischen Markern wie z.B. Arzneimitteln und deren Metaboliten, Tumormarkern, Proteinen oder, Peptiden in Gewebeschnitten diagnostiziert werden. [171-173] Neben dem Einsatz der bildgebenden Massenspektrometrie in medizinischen Fragestellungen, sind in den letzten Jahren andere, biologisch relevante Untersuchungen beschrieben worden. [174] Interessante



Beispiele von MALDI-TOF MSI an Pflanzen sind u.a. der Nachweis die Verteilung von Agrarpestiziden in Sojabohnen (*Glycine max*) [175], von Zuckerbestandteilen in Weizen (*Triticum aestivum*) [176], von kleinen Molekülen im  $m/z$  Bereich von 593-820 in Samen von Kulturgerste (*Hordeum vulgare*) [177] und Reis (*Oryza sativa*) [178, 179] oder der Metabolitverteilung in Weintrauben (*Vitis vinifera*) [180]. Insbesondere der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) ist eine im MALDI-TOF MSI häufig untersuchte Modelnpflanze. [181-185] Eine andere Arbeit beschrieb MSI-Untersuchungen an Rapssamen in einem frühen Stadium der Keimung sowie an infizierten und gesunden Weizensamen (*Fusarium graminearum*). [186]

Das Potenzial der Imaging-Methode kommt zum Tragen, wenn es an ganzen Organismen oder Teilen davon angewendet wird, wie das Imaging von Ameisen [187], von dorsalen Flügeln der grauen Fleischfliege (*Neobellieria bullata*) oder die Untersuchung ganzer Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*). [76, 78, 184] Neben dem 2D gibt es mehrere dreidimensionalen Imaging-Ansatz. Dabei kann die Probenhöhe zum einen über die Lasereindringtiefe (engl. *focal plan*) berechnet werden wie beispielsweise an einem Blatt des Gänseblümchens (*Bellis perennis*) gezeigt [188] oder die Probe wird zum anderen durch eine Kryoschnittmethoden in separate 2D Ebenen zerlegt. [182, 189] In Abhängigkeit von der Größe der untersuchten Probe, dem Abstand von Spektrum-zu-Spektrum, d.h. der lateralen Auflösung und des zu messenden Massenbereichs können MSI-Datensätze in der Größenordnung von  $10^7$ - $10^9$  Datenpunkten erzeugt werden. [190-196] Zur deren Auswertung werden daher verschiedene chemometrische Verfahren getestet, angewendet und diskutiert. [190-196] McCombie *et al.* zeigte 2005 erste multivariate Analysen an Imaging-Datensätzen von Mäusegehirnschnitten, um spektrometrisch Regionen von Interesse zu clustern. [197] Ferner verglich Hanselmann *et al.* 2008 die Methode der Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit der Unabhängigkeitsanalyse (ICA), der nicht-negativen Faktorenanalyse (NN-PARAFAC) und der probabilistischen-latenten semantischen Analyse (pLSA) an simulierten und realen Imaging-Datensätzen von Brustgewebe. [198] Mittlerweile existiert ein großes Kollektiv an Auswertesoftware, wie SCiLS Lab [199] oder, basierend auf dem offenen imzML-Datenformat [200], die Open-Source Software msiQuant [201] und SpectralAnalysis [202].

Ein kritischer Punkt der MALDI-TOF Massenspektrometrie und insbesondere der Imaging-Technik stellt die Auftragung der Matrix dar. Dies kann durch eine Vielzahl von Methoden, wie Pipettieren, Sprühen, Tropfen, Sublimieren, Drucken oder Eintauchen erfolgen. [150, 203-211] Entscheidend ist die Matrix so auf die Probe aufzubringen, dass einerseits die Analyten aus der Probe extrahiert werden, andererseits die lokale Position der Analytmoleküle bei der Auftragung nicht verändert wird. [212]

Dabei sind pneumatische und elektrostatische Matrix-Sprühtechniken auf den Probenpunkt am weitesten verbreitet. [213] Hierzu gibt es kommerziell erhältliche Module, wie das Bruker ImagePrep System, den HTX MS Sprayer oder den SunCollect MALDI Spotter. Eine Abwandlung dieser Techniken bietet das Drucken der Matrix mit einem speziellen Chemikaliendrucker (CHIP-1000) oder selbst umgebauten Druckern. [206] Die geringe Größe der Aerosoltröpfchen, die durch solche Sprühtechniken erzeugt werden, begrenzt die Translokation und Vermischung von Analyten auf dem Probenpunkt effektiv auf den jeweils benetzten Bereich. [148] Dabei sind jedoch die schlecht kontrollierbare Tropfengröße, die geringe Matrixmenge und die schnelle Verdunstung des Matrixlösemittels für die Extraktion des Probenmaterials kritisch zu betrachten. [148] Um die Extraktion zu verbessern, wird in einigen Studien unter humiden Bedingungen gesprüht oder die Probe nachträglich befeuchtet. [148]

Anders als bei der Sprühbeschichtung ist die Tropfenauftragung häufig besser zur Extraktion geeignet. [214] Kleinere, eng beieinander liegende Tropfen (engl. *micro-/nanospotting*) eignen sich dabei am besten für hochauflösende Bilder, sind aber aufwendig zu erzeugen. [214]

Im Gegensatz zur diesen Dried-Droplet-Methoden wurde beschrieben, dass ein Sublimieren der Matrix in einer Steigerung der Anfangsgeschwindigkeit der Ionen resultiert. [150] Jedoch korrelierte das Sublimieren der Matrix auch mit geringerer Ionenenergie, was eventuell auf die inhomogenere Oberfläche zurückzuführen war. [149] Hankin *et al.* berichten dagegen, dass Sublimieren einen gleichmäßigen Film kleiner Matrixkristalle auf Mäusegehirnschnitten hinterlässt. [205] Thomas *et al.* publizierten zum Sublimieren der Matrix eine Tabelle, die für eine Reihe von Substanzen optimierte Sublimationstemperaturen, -zeiten und -mengen angibt. [210] Das Sublimieren verdampfter Matrixlösungen auf gekühlten Probenträgern wurde u.a. zur Untersuchung von Tabletten und Gewebeschnitten angewendet. [150, 195, 215]

Im Gegensatz dazu wird bei der Eintauchtechnik der zu untersuchende Bereich komplett in die Matrixlösung getaucht. [203, 214] Dieses ist meist für die Extraktion von Proteinen vorteilhaft, ermöglicht aber die Analytmigration in der Probe bzw. in das Lösungsmittel. Solche Auftragungen sind daher eher für das Profiling als für das Imaging geeignet. [203, 214]

## 2.4 Pollenanalyse

Pollenkörner sind kleine biologische Partikel, die von Samenpflanzen zur Fortpflanzung erzeugt werden. Blütenstäube verbreiten sich entweder anemogam (windblütig), zoogam (tierblütig) z.B. durch Bienen oder hydrogam (wasserblütig) durch Gewässer. Da windbestäubte Pollenkörner nicht auf direktem Weg zu den weiblichen

Empfangsorganen (Blütennarbe oder Mikropyle) gelangen, produzieren windblütige Pflanzen wie Kiefern oder Gräser übermäßig viele Pollenkörner. [1] Diese Pollenkörner zählen zu den Bioaerosolen, unter denen auch andere luftgetragene Mikroorganismen, Pilzsporen oder Partikel zusammengefasst werden. Bestimmte Arten von Bioaerosolen sind sowohl einzeln, als auch in Kombination (Kreuzallergien) von besonderer Bedeutung, da sie beim Menschen im Nasenrachenraum allergologische Reaktion auslösen. [216, 217] Sie werden daher auch Aeroallergene genannt. [216, 217] Bei Pollen scheint es dabei bestimmte Proteinfamilien wie z.B. Expansin oder Amb a-Proteine wie Profilin, Polcalcin, Pektatlyase oder Plastocyanin zu geben, die ein hohes allergenes Potenzial aufweisen. [216, 217] Pollenallergene können dabei entweder allgegenwärtig wie z.B. Profiline sein, nur in bestimmten Pflanzenfamilien wie z.B. Pektatlyasen vorkommen oder nur beschränkt auf ein einzelnes Taxon nachgewiesen werden. [88, 217-238] Neben der Frage, welche Allergene wie wirken, ist für Betroffene das zeitliche Vorkommen von Pollen entscheidend. Um Allergiker über das zu erwartende Belastungsrisiko zu informieren, ist ein Informations- und Warnsystem zum Pollenflug ein wichtiger Aspekt in der Wettervorhersage. Die aktuellen, meteorologischen Techniken zur Pollenbestimmung basieren hierbei auf der mikroskopischen Auswertung gesammelter Pollenkörner. [1, 239, 240]

Pollenkornoberflächen bestehen aus einer doppelten Wandung (Sporoderm) mit einer äußeren (Exine) und inneren Schicht (Intine). [241-246] Pollen weisen eine gattungsspezifische Morphologie der Exine auf, wie schlitzförmige oder runde Aperturen (Keimöffnungen) oder andere Strukturen auf der Oberfläche, wie Stachel, Stäbchen oder netzartig Strukturen. [241-246] Im Gegensatz zum runden, glatten Erscheinungsbild von windblütigen Pollenkörnern verfügen tierblütige Pollenkörner häufiger über supratectale Skulpturen und eine klebrige, extrazelluläre Matrix auf der Oberfläche. [241-246] Die widerstandsfähige äußere Schicht des Pollenkorns ist zu einem großen Teil aus stark vernetzten, stickstofffreien Heteropolymeren (Sporopollenin) aufgebaut, während die darunterliegenden Intinen vorrangig Pektin und Cellulose enthalten. [247] Da aus den Intinen bei Keimung des Pollenkorns der spätere Pollenschlauch hervor geht, lassen sich im Pollenschlauch Pektin und Arabinogalactan detektieren. [248]


In sogenannten Pollenfallen, wie dem Burkard-Sporenprobenehmer [239, 240] werden Pollen und andere Bioaerosole bei konstantem Luftstrom von  $10 \text{ l min}^{-1}$  auf einem klebenden, transparenten Kunststofffilm gesammelt, der 7 Tage lang auf einer Trommel mit festem Umfang montiert ist. [239, 240] Die mikroskopische Bestimmung der eingefärbten Pollenkörner auf Grundlage von Form und Struktur (Morphologie) erfordert jedoch qualifizierte Mitarbeiter, die aus Zeitgründen nur wenige, zufällig ausgewählte Bereiche des Bandes untersuchen. [239, 240, 249] Außerdem wird die Probenahme

stark durch lokale Umwelteinflüsse beeinflusst, z.B. durch einzelne Sträucher und Bäume in unmittelbarer Nähe der Falle. [1, 249] Diese z.T. stark reduzierten Daten aus lediglich 51 Pollenfallen in Deutschland bilden die Grundlage für die Erstellung von Kalendern zur Pollenflugvorhersage. [1, 239, 240, 249] Zur schnelleren und einfacheren, pollenanalytischen Differenzierung wären jedoch alternative Techniken wünschenswert. Da Formerkennungsalgorithmen von mikroskopischen Pollenkornaufnahmen anfangs noch zu unpräzise waren [250, 251], wurden spektroskopische und spektrometrische Methoden zur zuverlässigen Untersuchung von Pollenkörnern entwickelt. Der Einsatz von Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR), Raman-Spektroskopie und oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS) zur Charakterisierung von Pollenproben beschrieben daher bereits mehreren Gruppen. [2, 4, 29, 49, 252, 253] Dabei konnte eine Klassifizierung der Pollenproben durch Kombination der Messergebnisse mit multivariaten Statistiken, wie der hierarchischen Clusteranalyse (HCA), der partiellen Least-Squares-Regression (pLSR) und der Hauptkomponentenanalyse (PCA) [30, 52, 252], erreicht werden. Die Autofluoreszenz stellt eine weitere Technik dar, die erfolgreich zur Klassifizierung verschiedener Pollenproben eingesetzt wurde. [254] Insbesondere in Kombination mit morphologischen Eigenschaften wie z.B. die Größe ermöglichte die Identifizierung verschiedener Arten anhand des blau/roten Autofluoreszenzverhältnisses. [255]

In den letzten Jahren hat eine Gruppe an der BAM MALDI-TOF MS als neues Verfahren zur Identifizierung und Klassifizierung von Pollenkörnern vorgestellt. [3, 5, 89] Im Gegensatz zur selektiven Untersuchung und Strukturaufklärung von bestimmten Pollenbestandteilen, wie Lipiden [234, 256], Proteinen [87, 257-261], Glykanen [262], Sacchariden [263, 264], Flavonoiden [265] oder Sporopolleninen [266], erfordert die Identifizierung von Pollenproben mit MALDI-TOF MS keine Extraktion, chemische Modifikation oder chromatographische Trennung bestimmter molekularer Spezies und lässt sich daher als einfache und schnelle Technik betrachtet. [267] Darüber hinaus zeigte sich die Anwendbarkeit dieser Technik für die Charakterisierung verschiedener Arten in Mischungen, die aus größeren Mengen von Pollenkörnern bestehen. [89] In Verbindung mit der PCA lassen sich spezifische Massenregionen und Peakmuster zur Bestimmung vom Pflanzengattung identifiziert. [5] MALDI-TOF MS ermöglicht zudem die Differenzierung verschiedener Pollenproben innerhalb derselben Gattung. [3] Die ersten auf MALDI-TOF MS basierenden Analysen erforderten zunächst getrennte Fixations- und Extraktionsschritte, gefolgt von der Zugabe der Matrix. Diese noch zeitaufwändige Präparation wurde im Folgenden modifiziert und vereinfacht. Dazu wurden die Pollenkörner mit einem Klebeband auf dem Probenträger (engl. *target*) fixiert und die Anzahl der Präparationsschritte reduziert. [267]

## 2.5 Musterbasierte Datenanalyse von Massenspektren

Zur Datenanalyse und Darstellung wird in der vorliegenden Arbeit eine numerische Analysesoftware namens Matlab verwendet. Auf der Matlab-Benutzeroberfläche gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Eingabe von mathematischen Kommandos. Nacheinander lassen sich Befehle frei in die Kommandozeile eingeben. Sollten sich allerdings Befehle wiederholen oder Variablen miteinander verknüpft werden, so ist der sogenannte Matlab-Editor vorzuziehen. Dieser Matlab-Editor kreiert .m-Dateien, in welchen die Sequenzen der ausführbaren Befehle (Skripte) zusammengesetzt sind. Da diese Funktions-Datei zunächst über keinen Input oder Output verfügt, greift der Matlab-Editor beim Ausführen der m-files auf eingegebene oder hinterlegte Variablen im Arbeitsbereich (engl. *workspace*) zu. Alle Variablen, die zur Berechnung kreiert und herangezogen werden, speichern bzw. verändern sich automatisch im workspace. So bietet der workspace einen direkten Einblick auf Veränderung, Typ oder Inhalt einer der Variablen.

Wenn eine Matlab-Sequenz von Befehlen im Skript-Editor zu umfangreich wird, gibt es verschiedene Lösungsansätze. Eine Option ist, das Skript über zwei Prozentzeichen (%%) in Sektionen zu unterteilen und jeweils eine neue Überschrift zu vergeben. Diese Sektionen können über die Navigation mit dem  Go To-Befehl direkt angewählt werden. Alle Textfolgen, die sich in einer Zeile hinter einem Prozentzeichen befinden, markiert der Editor als nicht ausführbaren Kommentar in grün. Eine weitere Option zur Vereinfachung ist, bestimmte Berechnungsfolgen als eigenständige Funktion auszukoppeln und die m-Datei dieser Funktion über den Namen im Editor wieder einzubinden. Dieses Zerlegen in einzelne Funktionen findet sich in vielen Programmiersprachen mit den unterschiedlichsten Nennungen „subroutine“, „subprogram“, „procedure“, „method“, „function“, „routine“ wieder. In Matlab heißen sie Funktionen. Demzufolge ist Matlab eine Kollektion tausender Funktions-.m-Dateien (engl. *built-in functions*), die über deren Namen aufgerufen und ausgeführt werden. Ist ein Name noch nicht vergeben, so lässt sich diese Textfolge für eigene Funktionen oder Variablen nutzen. Eine andere Möglichkeit, Skripte zu vereinfachen bzw. für den Anwender zugänglich zu machen, bietet die Entwicklungsumgebung für graphische Benutzeroberflächen, auf die in Kapitel 2.5.3 gesondert eingegangen wird.

Aufgezeichnete Massenspektren sind zweidimensionale Darstellungen der Ionenhäufigkeit gegen das Ionenmasse-zu-Ladung-Verhältnis. Sie können einzeln oder kollektiv ausgewertet werden. Möglichkeiten zur Auswertung eines Einzelspektrums sind die Selektion von intensiven Signalen (engl. *peaks*), das Berechnen von Signal-Rausch-

Verhältnissen, das Erkennen von Peakmustern oder die Strukturaufklärung von Peaks durch Fragmentierung oder Literaturrecherche. Diese Möglichkeiten beziehen sich zum einen auf einzelne Variable wie z.B. den Intensitätswert eines Peaks oder zum anderen auf mehrere Variablen (multivariate Peakmuster) des Einzelspektrums. In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf die Auswertung von Peakmustern und dabei insbesondere auf die multivariate Analyse (MVA) ebendieser gelegt, da solche Muster für jede Probe spezifisch sind.

Beim Vergleich von Peakmustern in mehreren Spektren werden Zusammenhänge und Abhängigkeiten untersucht. Eine so durchgeführte Korrelationsuntersuchung lässt sich als multivariate Analyse beschreiben. Da Spektren in der Regel irrelevante Variationen enthalten, die durch technische oder instrumentelle Artefakte verursacht wurden, bedarf es vor einer MVA einer Datenaufbereitung. Zur Reduzierung irrelevanter Variation wie z.B. dem spektralen Untergrund oder zur Anpassung der Kompatibilität bei Fusion von Daten ist so eine spektrale Vorbehandlung der Massenspektren erforderlich. Geeignete Verfahren, wie Interpolation, Linienkorrektur oder Normierungen werden im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

### 2.5.1 Vorbehandlung der Spektren

Die MALDI-Messdaten enthalten pro Spektrum ca. 24000 Datenpunkte (Variablen). In Abhängigkeit davon, wie viele Spektren in die Matrix zur multivariaten Auswertung eingehen, wird eine Datenreduktion erforderlich. Studien belegen, dass auf Grund der Rechenleistung des eingesetzten Computers umfangreiche Codesequenzen bei zu großen Datensätzen entweder eine extrem lange Rechenzeit aufweisen oder schlimmstenfalls den ‚out of memory error‘ ausgeben. [192, 268] Alan Race zeigt dieses Problem beim Matlab `princomp`-Befehl an großen MALDI-TOF Imaging-Datensätzen in seiner Veröffentlichung von 2013. Die Rechenleistung und damit verbunden die Rechenzeit verhält sich hier exponentiell zu der Zahl der Variablen. [192] Zur spektralen Vorbehandlung werden daher Algorithmen eingesetzt, die die Anzahl an Variablen und dabei zusätzlich irrelevante Variationen reduzieren. Die Optionen zur Datenreduktion sind vielfältig, und reichen vom Eingriff in die primären Inhalte über Feature-Selektion bis hin zur Interpolation des Datensatzes. [269] Ziel der Datenreduktion sollte dabei sein, eine möglichst informationsverlustfreie Reduktion bei größtmöglicher Verkürzung der Rechenzeit und Reduzierung irrelevanter Varianzen zu erreichen. [270-272] Viele Literaturstellen beschrieben entsprechend, wie eine selektierte Peakliste zur multivariaten Datenanalyse herangezogen wird. [273, 274] Trotzdem gibt die

Beschränkung auf weniger Variablen nur eine grobe Näherung der spektrometrischen Wirklichkeit wieder.

Deswegen wurde in dieser Arbeit zur spektralen Vorbehandlung der Messergebnisse auf das Interpolieren der Daten gesetzt. Zusätzlich wurden die Spektren basislinienkorrigiert und über diese Rauschunterdrückung Untergrundsignale korrigiert. Dies unterstützt eine klare Differenzierung zwischen Peakmustern und Untergrundsignalen. Um eine differenzierte Klassifizierung mehrerer Spektren vornehmen zu können, ist häufig eine Normierung der Signale hilfreich. Die genauen, in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Interpolation, Basislinienkorrektur und Normierung sind ferner Kapitel „Material und Methoden“ in Abschnitt 4.6 erklärt.

## 2.5.2 Klassifizierung und Identifizierung von Datensätzen

Viele Datenanalyseverfahren suchen nach einer geeigneten Darstellung der Daten, wobei typischerweise latente Zusammenhänge in den Daten hervorgehoben werden sollen und so die Dimensionalität der Daten reduziert werden kann. Im Folgenden sollen drei Varianten der Datendarstellung und Reduktion vorgestellt werden, die nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF), die hierarchische Clusteranalyse und die Hauptkomponentenanalyse (PCA). Die genauen Berechnungen dieser Algorithmen findet sich im Kapitel 4.7 der Material und Methoden.

### **Nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF)**

In der Chemometrik ist die nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF) eine eher selten verwendete Technik zum Berechnen von teilbasierten, linearen Darstellungen des ursprünglichen Datensatzes. [275-278] Diese Faktorisierung errechnet eine lineare, approximative Datendarstellung, indem die Datenpunkte in zwei Matrizen,  $W$  mit Faktorenwerte und  $H$  mit Faktorenladung, zerlegt werden. [275-278] Im Gegensatz zur einer PCA enthalten  $W$  und  $H$  aufgrund der Negativitätsbeschränkung keine negativen Werte und bilden so ein simples, additives Modell. [275-278] Die NMF eignet sich daher besonders gut, wenn eine quantitative Fragestellung vorliegt. [275-278] Diese Methode wurde beispielsweise zur Bestimmung der Aspartam-Konzentration in Tabletten angewendet. [195] Trotz dieses Erfolgs gibt es Datensätze, bei denen die NMF nicht in der Lage ist, eine interpretierbare Zerlegung der Daten zu erzielen. [279]

### **Hierarchische Clusteranalyse (HCA)**

Eine Clusteranalyse versucht Objekte mit ähnlichen Attributdaten zusammenzufassen, indem sie natürliche Gruppierungen in Daten sucht. Die hierarchische Clusteranalyse funktioniert durch sukzessives Zusammenfügen ähnlicher Objekte, hier Spektren, beginnend mit jedem Spektrum als separate Gruppe, bis alle Spektren in einer einzigen Gruppe

zusammengefasst sind. Da keine Clusterzugehörigkeit vorgegeben wird, stellt diese Herangehensweise ein unbeaufsichtigtes (engl. *unsupervised*) bottom-up-Verfahren dar. [49, 273, 280] Jede iterative Fusion erstellt eine neue Gruppe, die entweder ein Spektrum einer bestehenden Gruppe zuordnet oder zwei noch nicht zugeordnete Spektren zu einer Gruppe verbindet. [49, 273, 280] Dabei gibt es eine Vielzahl von möglichen Clustering-Methoden, die darauf basieren, wie das Maß der Ähnlichkeit zwischen Spektren berechnet wird und welche Regeln zur Verknüpfung der Gruppen verwendet werden. [49, 273, 280] Aus diesen Berechnungen resultiert ein Dendrogramm, welches die gebildeten Gruppierungen und Abstände zwischen den Gruppen illustriert. [49, 273, 280] Eine als Maß der Entfernung von mehreren Objekten häufig verwendete Berechnung basiert auf der euklidischen Distanz. [49, 273, 280] Ein nachfolgender möglicher Ansatz zur Gruppierung ist der Ward-Algorithmus, welcher versucht bei Verknüpfung eine möglichst geringe Zunahme der Varianz (auf Grundlage des kleinsten Quadrats) innerhalb der Gruppe zu erzeugen. [49, 273, 280] So ist es möglich mit einer Clusteranalyse auf Grund der verschiedenen Abstands- und Verknüpfungsverfahren unterschiedliche Antworten zu erhalten, wenn man a) verschiedene Techniken mit den gleichen Daten, b) die gleichen Techniken mit unterschiedlichen Daten oder c) gleiche Techniken und gleiche Daten verwendet, vorher aber eine triviale Operation, wie die Umkehrung der Reihenfolge derselben Daten, durchgeführt hat. [281]

### **Hauptkomponentenanalyse (PCA)**

In der Chemometrik und in vielen weiteren Forschungsbereichen ist die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) eine der vielseitigsten und leistungsfähigsten Auswertemethoden. [274, 280, 282, 283] Spektrometrische, d.h. hochdimensionale, multivariate Datensätze enthalten viele Variablen, die auf Grund einer gewissen Redundanz wenig zum Informationsgewinn beitragen und so eine Differenzierung des Datensatzes erschweren. Diese Ähnlichkeit führt dazu, dass die Variablen ähnlich auf einen gemeinsam zugrunde liegenden Faktor reagieren würden. Um solche ähnlichen Variablen zu reduzieren, ohne Informationen zu verlieren, werden geeignete Linearkombinationen der Originalvariablen gesucht. [280, 282] So kann die Kovarianz- oder Korrelations-Matrix der Variablen eine grobe Schätzung der Gesamtorientierung der Datenwolke im multivariaten Raum wiedergeben. [284-288] Die Hauptkomponentenanalyse verwendet eine Eigenwertzerlegung dieser Kovarianzmatrix, um einen rotierten Satz von orthogonalen Komponenten, den sogenannten Hauptkomponenten im varianzgewichteten Vektorraum zu erzeugen. [284-288] Eng korrelierte Variablen werden dementsprechend in der gleichen Hauptkomponente (PC) zusammengefasst. Die PCs sind nach dem Betrag der von ihnen beschriebenen Gesamtabweichung hierarchisch sortiert. So ist die erste PC in Richtung der größten Varianz der Daten ausgerichtet, die zweite PC zeigt orthogonal zur ersten PC in Richtung der zweithöchsten Varianz, und so weiter. [284-288] Die



Gesamtabweichung der Daten ergibt sich aus der Summe der Eigenwerte der Kovarianzmatrix. Der Anteil der Varianz, der durch jede PC erklärt wird, ergibt sich aus dem entsprechenden Eigenwert dividiert durch die Summe der Eigenwerte. [284-288] Die PCs ermöglichen die Untersuchung der Originaldaten mit vielen Variablen und die Darstellung des multivariaten Charakters bei einer kleinen Anzahl von Dimensionen. [280, 282] Ein Streudiagramm der Daten entlang der PCs zeigt so tendenziell mehr über die Varianzen der Daten an, als das Plotten im ursprünglichen Variablenraum. [282] Eine PCA kann dementsprechend vielseitig angewendet werden und einen vereinfachten Überblick über komplexe multivariate Daten geben. [274, 280, 282, 283] Insbesondere werden in einer PCA Beziehungen oder Muster zwischen Variablen aufdecken und über den gezielten Ausschluss von PCs lassen sich irrelevante Merkmale reduzieren. [274, 280, 282, 283]

### 2.5.3 Graphische Benutzeroberfläche

Wie zu Beginn des Abschnittes beschrieben, gibt es in Matlab verschiedene Arten, den `function`-Befehl einzusetzen. Eine Primärfunktion zum Beispiel wird in einer separaten `.m`-Datei abgelegt und besteht aus folgender Befehlszeile:

```
function [ output_arguments ] = FcnName ( input_arguments )
```

Nachfolgend können dann entsprechende Rechenbefehle eingefügt werden und die Primärfunktion schließt mit einem `end`. Wie beschrieben kann über den Namen der Funktion (`FcnName`) die enthaltene Berechnung jederzeit an anderer Stelle eingebunden werden. Darüber hinaus lässt sich der `function`-Befehl innerhalb eines Skripts oder einer Primärfunktion geschachtelt als Subfunktion einsetzen. Variablen, die in einer `function`-Berechnung kreiert und verwendet werden, lassen sich nur über die Input- und Output-Argumente austauschen, da jede Funktion über einen eigenen workspace verfügt. Dieses Prinzip macht sich die graphische Benutzeroberfläche (GUI) zunutze, indem jedes eingefügte Objekt eine Funktion mit eigenständigem workspace ist. Da so die einzelnen Zwischenberechnungen nicht mehr allgemein gespeichert werden, verringert sich die Rechenzeit. Zudem erhöht dies die Übersichtlichkeit und ermöglicht insbesondere fremden Anwendern eine komfortable Nutzung der Berechnungen. Ein weiterer Vorteil der GUI ist die programmierbare, sofortige Darstellung von Berechnungsschritten über Diagrammflächen oder Anzeigetabellen. Diese lassen sich von Objekt zu Objekt zusätzlich vollautomatisch verändern. Außerdem kann eine GUI nach Kompilierung als geschützte stand-alone-Anwendung genutzt werden, die dann unabhängig von Matlab und dem Skript ist.

## 3. Zielsetzung der Arbeit

An der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung und der Humboldt-Universität zu Berlin wurden in Verlauf der letzten Jahre bereits experimentelle Arbeiten zur chemischen Analyse und Differenzierung von Pollenproben durchgeführt. Diese begannen mit den Forschungsarbeiten von F. Schultes [2, 29], und wurden mit der Masterarbeit von B. Krause [5] und der Dissertation von S. Seifert weitergeführt [3, 30]. Darüber hinaus befassten sich weitere Dissertationen [289] mit dem Keimverhalten von Pollenkörnern und, im Fachbereich 1.5 der BAM, mit dem allergenen Potential von Pollenproteinen. [290]

Aufbauend auf diesem Forschungs- und Kenntnisstand ergibt sich für diese Arbeit folgendes Ziel: Das MS-Verfahren muss so vereinfacht und optimiert werden, dass eine geringe Anzahl von Pollenkörnern in künstlichen und realen Mischungen charakterisiert und taxonomisch zugeordnet werden kann. Dieses Verfahren sollte auf Grund der hohen Bedeutung der Pollenflugvorhersage in der Meteorologie eine tatsächliche Probenahme-Situation authentisch abbilden und auf einer effizienten und schnellen Analyse basieren. Mit Blick auf eine solche Vereinfachung der präparativen Methoden und der Auswertung mit multivariaten Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Ansätze entwickelt und optimiert.

Im ersten Teil in Kapitel 5.1 der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Vor- und Aufbereitung von Pollenproben untersucht. Darin werden u.a. instrumentelle Einstellungen und Aspekte der Probenpräparation beschrieben, die entscheidend dafür sind, massenspektrometrische Muster von Pollenproben reproduzierbar messen zu können. In diesem Kontext war die Wahl geeigneter Probenträger und der Matrix von besonderer Bedeutung. Außerdem wurde die Extraktion der Analyten von der Pollenoberfläche intensiv untersucht und die Pollenauftragung insgesamt vereinfacht. In allen Abschnitten der vorliegenden Arbeit war die Anpassung multivariater Verfahren wie der Hauptkomponentenanalyse (PCA), der hierarchischen Clusteranalyse (HCA) oder der nicht-negativen Matrix-Faktorisierung (NMF) zur Auswertung der Messdaten unabdingbar. Zur schnellen, statistischen Auswertung der Massenspektren des ersten Teiles wurden daher die verwendete PCA und weitere Funktionen in eine selbst-programmierte, graphische Benutzeroberfläche integriert.

Da Pollenkörner verschiedenster Arten in realen Systemen vorrangig in Mischungen vorkommen, ist man häufig mit dem Problem der Diskriminierung einzelner,

möglicherweise wichtiger, massenspektrometrischer Signale konfrontiert. Dies wurde im zweiten Teil der Arbeit in Kapitel 5.2 untersucht. Dazu wurde ein neuer Ansatz, der auf einem simulierten Mischdreieck bestehend aus 66 Einzelmessungen beruht, erstellt und ausgewertet.

Im darauffolgenden Abschnitt in Kapitel 5.3 wurden die Ergebnisse der MALDI-TOF Imaging MS-Experimente an Pollenmischungen beschrieben und verschiedene statistische Auswerte-strategien dargestellt. Darüber hinaus wurden hier unterschiedliche Methoden zur Auftragung der Matrix in Imaging-Experimenten diskutiert. Im finalen Teil dieses Abschnittes wird beschrieben, ob und wie eine Charakterisierung und Identifizierung einer realen Pollenmischung mit dem erstellten und optimierten Verfahren erreicht werden kann.

Die Pollenanalyse mit einem alternativen, massenspektrometrischen Ansatz, der DART-Massenspektrometrie, wird dann im letzten Kapitel 5.4 der Ergebnisse beschrieben. Diese Untersuchungen erfolgten mit dem Ziel, herauszufinden ob die erhaltenen, vorwiegend niedermolekularen Informationen komplementär zur MALDI-Methodik genutzt werden können.

Der vorgestellte Ansatz stellt eine neue, zuverlässige Methode zur Pollenbestimmung dar, die nicht auf der individuellen, visuellen Beurteilung, sondern auf einer spektrometrisch-analytischen Basis beruht.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Pollenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von 2015 bis 2017 Pollenkörner von verschiedenen Pflanzen im botanischen Garten von Berlin gesammelt und gemessen. Dazu wurde eine Metadatenbank generiert, die von 2012-17 reicht und über 400 einzelne Pollenproben enthält. Nach der Probenahme wurden die Pollenproben bis zur Verwendung in Eppendorf-Röhrchen bei -20 °C gelagert. Darüber hinaus gab es einen kommerziellen Anbieter (Sigma Aldrich), der aufbereitete Pollenproben von 9 Pflanzenarten bereitstellte. Diese Proben wurden im Kühlschrank gelagert. Allerdings war nicht angegeben, wie die Pollen haltbar gemacht wurden. Derzeit sind jedoch die meisten Produkte nicht mehr erhältlich.

### 4.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 4-1: In der Arbeit verwendete Chemikalien mit jeweiligem Verwendungszweck.

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Zweck</b>
3-AQ	Fluka	≥ 99 %	Matrix
Aceton	Carl Roth	≥ 99.5 %	LSM
ACN	ChemSolute	HPLC grade	LSM
Ameisensäure	Sigma Aldrich	95-98 %	Säure
Baumharz in Propanol	Plano GmbH	ohne Angaben	Präparation nach Neuner
Bernsteinsäure	Merck	p. A:	Säure
Cytochrome C	Sigma Aldrich	ohne Angaben	Kalibrierstandard
DHB	Sigma Aldrich	≥ 99 %	Matrix
Ethanol	Sigma Aldrich	p. A.	LSM
Gramicidin S	Sigma Aldrich	ohne Angaben	Kalibrierstandard
HABA	Sigma Aldrich	≥ 99 %	Matrix
HCCA	Sigma Aldrich	≥ 99 %	Matrix
IAA	Sigma Aldrich	≥ 99 %	Matrix
Insulin	Sigma Aldrich	ohne Angaben	Kalibrierstandard
Isopropanol	Sigma Aldrich	≥ 99 %	LSM
Methanol	Sigma Aldrich	p. A:	LSM
Oxalsäure	Merck	p. A.	Säure
SA	Sigma Aldrich	p. A.	Matrix
TFA	Sigma Aldrich	98.5 %	Säure
Ubiquitin	Sigma Aldrich	ohne Angaben	Kalibrierstandard
Wasser	ChemSolute	HPLC grade	LSM
Zitronensäure	Merck	p. A:	Säure

## 4.3 Probenpräparation

### 4.3.1 Probenauftragung

Für die Probenvorbereitung wurden die Pollenkörner je nach Untersuchung auf unterschiedliche Probenträger aufgetragen, die in der folgenden Tabelle 4-2 aufgeführt sind:

Tabelle 4-2: Übersicht möglicher Probenträger die im MALDI-Instrument verwendet werden können.

<b>Probenträger</b>	<b>Oberfläche</b>	<b>Punktgröße</b>
MTP 384	polierter Stahl	3-4 mm
Doppelseitiges Klebeband (engl. CT)*	leitfähiges Carbonband	wahlweise nach Zuschnitt
AnchorChip	hydrophob beschichteter Stahl	0,2 - 0,8 mm
pre-spotted AnchorChip <sup>+</sup>	hydrophob beschichteter Kunststoff	0,8 mm
Glasobjektträger	Metall beschichtetes (engl. ITO) Glas	ohne vorgegebenes Raster

\*P77817, Science Services GmbH, München; <sup>+</sup>231968, <sup>°</sup>237001 Bruker Daltonik GmbH, Bremen

In den meisten Fällen wurden die Pollenkörner abgezählt und unter einem Mikroskop (Leica MZ12<sub>5</sub> mit einer Kaltlichtquelle KL 1500 LCD) auf den entsprechenden Oberflächen abgelegt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden anschließend folgende Probenvorbereitungsschritte angewendet:

1. Säureextraktionen
2. Matrix-Applikation
3. MALDI-Messung

### 4.3.2 Analytextraktion

Die Säureextraktion der Analyten erfolgte wahlweise durch Tropfenextraktion, Gasphasenextraktion oder ohne einen zusätzlichen Extraktionsschritt. Bei der Tropfenextraktion wurde 1 µl der gewählten Säure direkt auf die Pollenprobe gegeben und die Verdunstung der Säure abgewartet. Für die Gasphasenextraktion wurde der Probenträger mit den aufgetragenen Pollenkörnern für eine bestimmte Zeit in eine mit Säure gefüllte, geschlossene Glaskammer abgelegt. Neben der standardmäßig eingesetzten Ameisensäure wurden im Abschnitt 4.1.2.1 noch weitere Säuren, genauer Oxal-, Bernstein- und Zitronensäure verwendet.

### 4.3.3 Matrixauftragung

Die Matrixsubstanzen aus Tabelle 5-1 wurden in geeigneten Lösungsmitteln (LSM) gelöst und auf die säureextrahierten Pollenkörner aufgetropft. Typischerweise wurden 10 mg Matrix

in 1 ml einer 1:1 Mischung (v/v) von Acetonitril/Wasser, welches zusätzlich Trifluoressigsäure (1,25 %) enthält, aufgelöst. Dieses Verfahren wurde im Experiment 5.1.2.4 zusätzlich mit einer Matrixlösung, die kein TFA enthielt, wiederholt. Darüber hinaus wurden in der Untersuchung zur Variation der Matrix (4.1.2.2) verschiedene weitere Matrix-LSM-Kombinationen getestet.

In Vorbereitung auf die später folgenden Imaging-Messungen von Mischungen von Pollenkörnern wurden im Kapitel 5.3.1 weitere Techniken zur Auftragung der HCCA-Matrixlösung untersucht. Hier kamen neben der Tropfenauftragung der Matrixlösung insbesondere das Airbrush-Verfahren, das Elektrospray-Verfahren, das Sieben und das Drucken der Matrix zum Einsatz.

Beim Airbrush-Verfahren wurde eine Airbrush-Pistole (Kit AT-AK-01, Agora-Tec®, Schmalkalden, Germany, Abb. 4-1) verwendet, die mit Stickstoff als Verneblungsgas und über einem höhenverstellbaren Tisch angebracht war. Der Abstand zum Probenträger betrug 15 cm.



Abbildung 4-1: (links) Foto der Airbrush-Pistole und (rechts) Foto der Vorrichtung mit verstellbarem Probentisch unter einem Abzug.

Die Elektrospray-Auftragung erfolgte mit einer an der BAM entwickelten Apparatur (ESAirD, Abb. 4-2). Dabei wird zwischen dem Probenträger und einer höhenverstellbaren Kapillare ein elektrisches Feld mit Hochspannung von + 6,5 kV angelegt. Die Matrixlösung wird mit einer separaten Spritzenpumpe bei einem Fluss von  $10 \mu\text{l min}^{-1}$  durch die Kapillare gefördert. Das Verdunsten des LSMs wird zusätzlich durch einen temperierbaren  $\text{N}_2$ -Gasstrom beschleunigt.

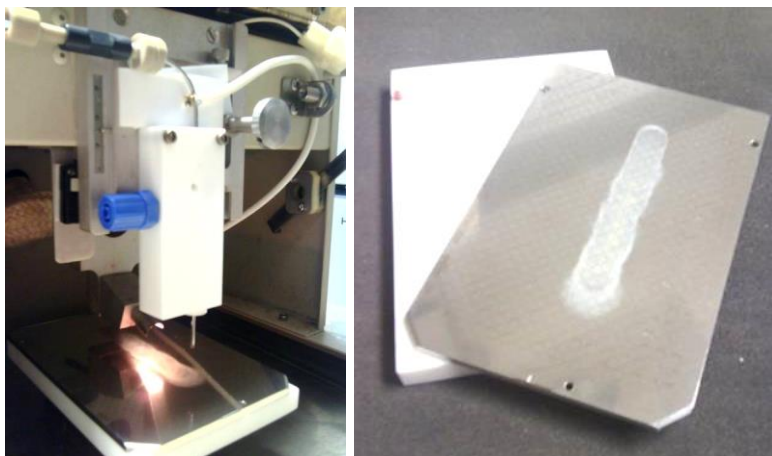


Abbildung 4-2: (links) Foto des Matrix/LSM-Elektrospray-ESAirD Geräts und (rechts) Foto einer aufgesprühten Matrixspur auf einem polierten Stahlprobenträger.

Zum Sieben der Matrix wurde zuerst das LSM pneumatisch versprüht und dann wurden die trockenen Matrixkristalle mit einem 500  $\mu\text{m}$ -Sieb aufgetragen.

Der nach einer Anleitung von Ryan Pourcille (Instructables.com) mechanisch umgebaute handelsübliche Tintenstrahldrucker (Epson Stylus C 84, Abb. 4-3) konnte lediglich für einige, wenige Imaging-Präparationen verwendet werden, da die Matrix schnell an den Düsen des Druckkopfes auskristallisierte, was zu einer irreversiblen Verstopfung der Düsen des Druckkopfes führte. Dies ließ sich trotz intensiver Ultraschallbehandlung des Druckkopfes nicht mehr rückgängig machen.



Abbildung 4-3: (links) Foto des umgebauten Druckers und (rechts) Foto einer als Word-Beispielbild aufgedruckten Matrix auf dem Stahlprobenträger.

Nach der Lösungsmittelverdampfung wurden die entsprechend präparierten Probenträger in das Vakuum des Massenspektrometers eingebracht und die jeweiligen Messungen gestartet.

## 4.4 Messgeräte und Einstellungen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kam hauptsächlich ein MALDI-TOF Massenspektrometer Autoflex III (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) zum Einsatz. Dieses ist mit einem Nd:YAG Smartbeam-Laser, der bei einer Wellenlänge von 355 nm arbeitet, ausgestattet. Alle Spektren wurden im positiven, linearen Modus mit einem MCP Detektor (siehe Kapitel 2.2.3 Geräteaufbau) aufgenommen. Das Bild eines Spektrums wird jedoch durch viele Faktoren beeinflusst. Neben äußeren Einflüssen wie der Leitfähigkeit des Materials spielen Messparameter wie Laserintensität, Beschleunigungsspannung, Laserfocus, Wiederholrate, Auflösung und Matrix-Suppression eine Rolle. Diese Lasereinstellungen wurden im Kapitel 5.1.1 genauer untersucht. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einer Untersuchung wurden daher die Lasereinstellungen während der Detektion der Spektren möglichst konstant gehalten. Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurde darüber hinaus das Instrument in regelmäßigen Abständen mit Biopolymerstandards wie Insulin, Ubiquitin, Cytochrom C, Gramacidin S kalibriert.

Die DART-Analysen wurden mit einem Bruker Apex-Qe Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) durchgeführt. Das Instrument wurde durch die Bruker ApexControl Software (V 3.0.0) gesteuert, wobei ein Messbereich von  $m/z$  200-2500 im positiven Ionenmodus gewählt wurde. Die DART-SVP-Ionisationsquelle (IonSense Inc., Saugus, MA, USA) wurde entsprechend montiert und erzeugte durch einen gerichteten Heliumstrom auf die Probe, die Ionen (Penning-Ionisation), welche dann im Massenanalysator für 16 x 1,0 s zu einem Spektrum akkumuliert wurden. Die Temperatur des DART-Heliumstroms wurde auf 200°C eingestellt.

## 4.5 MALDI-TOF Imaging

Zur Messung und Auswertung der bildgebenden MALDI-Experimente wurde die Software FlexImaging™ des Geräte-Herstellers verwendet. Für jedes Spektrum, welches hier zusätzlich im Namen die x,y-Positionsinformationen trägt, wurden 1000 Laserpulse akkumuliert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Punkt-zu-Punkt-Abstand, d.h. eine Pixelgrößen von 50 und 100 µm verwendet und verglichen. Zur besseren Visualisierung wurden die meisten Imaging-Datensätze zusätzlich mit multivariaten Methoden ausgewertet.



## 4.6 Spektrale Vorbehandlung der Messergebnisse

Alle Aufbereitungen von Spektren und multivariaten Analysen wurden mit der Matlab-Software (Version R2015a, The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA) durchgeführt. Dabei wurde eine Reihe von Standardfunktionen aus Matlab und aus der Statistics and Machine Learning Toolbox angewendet und in Coding-Sequenzen (Skripten) zusammengestellt. Insgesamt lassen sich diese Programmierungen und Berechnungen in verschiedene Teile gliedern: Datenreduktion, Basislinienkorrektur, Normierung und Auswertung.

### 4.6.1 Datenreduktion

Zur Datenreduktion durch Interpolation gibt es verschiedene Matlab built-in-Funktionen, wie `pchip`, `spline`, `interp1` oder `msresample`. Diese vier Funktionen basieren auf dem Prinzip der Interpolation. Dabei werden die gemessenen Datenpunkte über eine neue, kontinuierliche Funktion abgebildet. Dazu wird im Massenbereich des Spektrums eine untere und obere Grenze eines äquidistanten Basisbereichs definiert und verwendet. Der Abstand der Stützstellen beträgt einen ausgewählten  $m/z$ -Wert von beispielsweise  $\pm 2$ . Die Annäherung an die Originaldatenpunkte des Spektrums wird dann durch die Interpolationsfunktion an den Stützstellen möglichst exakt wiedergegeben.

### 4.6.2 Basislinienkorrektur

Zur Basislinienkorrektur wurden in dieser Arbeit drei Funktionen `baseline`, `asLS-baseline`, `msbackadj` angewendet. Die polynomiale Korrektur basiert auf einer Funktion namens `baseline`, die in abgewandelter Form von F. Gan [291] vorgeschlagen wurde. Über diese Funktion lässt sich anhand des jeweils ausgewählten Spektrums und einem Wert für den Grad des Polynoms ein polynomialer Vektor erstellen, der wiederum vom Ausgangsspektrum subtrahiert werden kann.

So ähnlich verfährt auch die `asLS-baseline` Funktion, bei der ein Vektor unter Verwendung eines asymmetrischen Algorithmus mit dem geringsten Quadrat zu jedem Spektrum erstellt wird, der sich wiederum vom Ausgangsspektrum subtrahieren lässt. Die verwendete Funktion wurde erstmals von P.H.C. Eilers vorgestellt und weiter optimiert. [292-295]

Aus der Bioinformation Toolbox bietet Matlab darüber hinaus mit der `msbackadj`-Funktion eine weitere Option zur Basislinienkorrektur an. Die Justierung der Basislinie des Spektrums erfolgt dabei in drei Schritten: Der Hintergrund entlang der x-Achse wird in mehreren

Fenstern geschätzt, dann wird eine Spline-Näherung der variierenden Basislinie erstellt und diese dann entlang der Achse angepasst. [296]

#### 4.6.3 Normierung

Zur Normierung wurden in dieser Arbeit die Vektornormierung, Normierung über die maximale Intensität, Normierung über die Summe der Signale (eng. total ion current, TIC, Totalionenstrom) und die `msnorm`-Funktion getestet.

Bei der Vektornormierung wird jeder Wert im Spektrum durch die Wurzel der Summe aller einzeln potenzierten Signale geteilt. Ähnlich verläuft die Normierung unter Verwendung des TICs, wo jeder Wert im Spektrum ins Verhältnis zur Summe der Signale des Spektrums gesetzt wird. [297, 298] Dieses Vorgehen wird abweichend ebenso als engl. *area under the curve* (AUC), also der Fläche unterhalb des Spektrums, bezeichnet, was dem TIC entspricht. Außerdem lässt sich ein Spektrum auf die maximale Intensität des Spektrums normieren. Bei den beschriebenen Normierungen handelt es sich zunächst nur um eine Division mit bestimmten Werten wie Summen, Maximum oder weitere. Mit der `msnorm`-Funktion bietet Matlab dagegen konkretere Befehlsargumente, um z.B. auf bestimmte Teilmengen des Spektrums näher einzugehen. [299-302]

### 4.7 Auswertung

Die erste Auswertung erfolgte meist über die Darstellung des Spektrums, das Bilden des Mittelwertes einer Gruppe von Spektren (Mittelwerts-Spektrum), die Berechnung des TICs eines Spektrums oder über die Peakanalyse eines Spektrums mit der `findpeaks`-Funktion (Signal Processing Toolbox). Im späteren Verlauf der Arbeit folgten bei Gruppierungs- und Clusterfragen der Silhouetten-Koeffizient und Dunn-Index, zur Vereinfachung der Programmierung die graphische Benutzeroberfläche und zur multivariaten Auswertung die `nnmf`-, `dendrogram`- und `pca`-Funktionen.

#### 4.7.1 Silhouetten-Koeffizient

Der `Silhouette`-Befehl aus der Statistics and Machine Learning Toolbox resultiert in einem Silhouetten-Wert für jedes Objekt wie z.B. ein Spektrum, eine Probe oder eine einzelne Spalte basierend auf vorab definierten Gruppen oder Clustern. Diese Silhouette ist ein Maß dafür, wie ähnlich das entsprechende Objekt den anderen Objekten in seinem eigenen Cluster ist, verglichen mit den Objekten in anderen Clustern. Die Silhouette eines Objektes  $o$  aus Cluster A mit dem nächstgelegenen Cluster B ist wie folgt berechnet:

$$S(o) = \frac{d(B,o) - d(A,o)}{\max\{d(B,o), d(A,o)\}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Standardmäßig verwendet der `Silhouette`-Befehl den quadratischen euklidischen Abstand als Distanz ( $d$ ) zwischen den Objekten. Der Silhouetten-Koeffizient (SK) ist dann der Mittelwert über alle Silhouetten. Ein großer SK-Wert zeigt kleinere Distanzen innerhalb der Cluster als von Cluster zu Cluster und die Eignung der vorab definierten Clusterlösung an.

#### 4.7.2 DUNN-Index

Im Gegensatz dazu setzt der Dunn-Index (DI) die minimale Inter-Cluster-Distanz ins Verhältnis zur maximalen Intra-Cluster-Distanz.

$$DI = \frac{\text{minimale Distanz zweier Cluster}}{\text{maximale Distanz innerhalb eines Clusters}} \quad \text{Gleichung 3}$$

Äquivalent zum Silhouetten-Koeffizient sind hier große Werte erstrebenswert, da sie eine verhältnismäßig große Distanz zwischen den Clustern und verhältnismäßig kleine Distanzen innerhalb eines Clusters versprechen. Julian Ramos programmierte dazu eine entsprechende `dunns`-Funktion, die über den Matlab File Exchange Server zu Verfügung steht und in dieser Arbeit angewendet wurde. [303]

#### 4.7.3 Graphische Benutzeroberfläche

Der Matlab `guide`-Befehl initiiert die GUI Design Environment Tools, mit denen eine GUI interaktiv erstellt oder bearbeitet werden kann. Dabei entstehen zwei Dateien: die `.fig`-Datei, in der die Objektinformationen gespeichert sind, und die `.m`-Datei, in der die Berechnungen programmiert werden können.

#### 4.7.4 Nicht-negative Matrix-Faktorisierung

Die nicht-negative Matrix-Faktorisierung mit der `nnmf`-Funktion basiert auf einer Komprimierung der Daten durch eine Low-Rank-Approximation des Merkmalsraums, wobei sich ausschließlich positive Faktorwerte und -ladungen ergeben. So entsteht ein additiv gewichtetes Modell nach folgender Gleichung (4):

$$A_k \cong W \times H \quad \text{Gleichung 4}$$

Ausgehend vom Merkmalsraum ( $n \times m$ -Matrix  $A$ ) und einem festgelegten Wert  $k$ , der nicht kleiner als  $\min(m, n)$  sein darf, berechnet die `nnmf`-Funktion zwei nicht-negative Matrizen  $W$  und  $H$ .  $W$  ( $n \times k$ , Faktorenwerte) repräsentiert dabei die Transformationen der Variablen und  $H$  ( $k \times m$ , Faktorenladungen) die Koeffizienten der linearen Kombinationen der ursprünglichen Variablen aus dem Merkmalsraum. Da eine solche Faktorisierung nicht exakt ist, sind  $W$  und  $H$  so gewählt, dass der quadratische Rest ( $D$ ) zwischen dem ursprünglichen Merkmalsraum und  $W \cdot H$  minimiert wird. [304]

#### 4.7.5 Hierarchische Clusteranalyse

Für die hierarchische Clusteranalyse (HCA) wird zunächst ein Distanzmaß für die Spektren festgelegt und berechnet. Danach erfolgt die Clusterbildung über einen entsprechenden Algorithmus, in dem wahlweise eine Clusteranzahl festgelegt werden kann. In dieser Arbeit wurde für die HCA das euklidische Distanzmaß und der Ward's Algorithmus mit der `linkage`-Funktion eingesetzt und die Clusteranzahl über die `dendrogram`-Funktion bestimmt.

#### 4.7.6 Hauptkomponentenanalyse

Als weiterer Ansatz zur Beurteilung spektrometrischer Unterschiede eines Datensatzes wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA) eingesetzt. Matlab bietet hierzu aus der Statistics and Machine Learning Toolbox die `pca`-Funktion an. Die Grundgleichung (5) der PCA sieht dabei wie folgt aus:

$$\begin{matrix} A \\ n \times m \end{matrix} = \begin{matrix} F \\ n \times k \end{matrix} \times \begin{matrix} L^T \\ k \times m \end{matrix} + \begin{matrix} \epsilon \\ n \times m \end{matrix} \quad \text{Gleichung 5}$$

Aus der Ausgangsdaten-Matrix ( $A$ ) entstehen über die Eigenwertzerlegung der Kovarianz/Korrelationsmatrix die Faktorwerte-Matrix ( $F$ ) und die Faktorladungs-Matrix ( $L$ ) sowie die Einzelrestfaktoren (Residuales  $\epsilon$ ). [284-288] In einem weiteren Teil der Arbeit wurde eine PCA von Referenzspektren ‚umgekehrt‘, um Faktorenwerte für Imaging-Spektren zu berechnen, die in der Referenzspektren-PCA nicht verwendet wurden.

$$\begin{matrix} F \\ \text{imaging} \end{matrix} = \begin{matrix} A \\ \text{imaging} \end{matrix} \div \begin{matrix} F \\ \text{ref} \end{matrix} \times \begin{matrix} L^T \\ \text{ref} \end{matrix} + \begin{matrix} \epsilon \\ \text{ref} \end{matrix} \rightarrow \quad \text{Gleichung 6}$$

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung einzelner Pollenproben dargestellt. Als erstes erfolgte eine Optimierung der instrumentellen und der experimentellen Parameter, gefolgt von der Programmierung einer selbstentwickelten graphischen Benutzeroberfläche (GUI) zur vereinfachten Auswertung der Daten. Im darauffolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse beschrieben und interpretiert, die bei der Untersuchung von Mischungen von Pollenkörnern unterschiedlicher Spezies mit den zuvor optimierten Bedingungen erhalten wurden. Diese bilden die Grundlage für die im nächsten Teil beschriebenen Imaging-Experimente von Mischungen von Pollenkörnern. Im letzten Abschnitt werden Untersuchungen von Pollenkörnern mit einer alternativen massenspektrometrischen Methode (DART) vorgestellt, die auf Grund einer anderen Ionisationsmethode zu zusätzlichen oder komplementären Ergebnissen führt.

### 5.1 MALDI-TOF MS von einzelnen Pollenproben

Pollenkörner enthalten charakteristische Bestandteile wie Proteine, Peptide und Kohlenhydrate, die mit massenspektrometrischen Verfahren detektiert werden können. Die spezifische Zusammensetzung dieser Verbindungen stellt eine Art von Fingerabdruck der jeweiligen Probe dar. Durch biochemische Verfahren lassen sich die meist hochmolekularen Moleküle in z.T. mehreren Schritten zerkleinern, mit Flüssigchromatographie trennen und durch MS-Verfahren identifizieren. Solche Schritte wie z.B. der tryptische Verdau von Proteinen, sind häufig aufwändig und zeitintensiv. Beim sogenannten BioTyping-Ansatz auf MALDI-TOF MS Basis liegt der Fokus dagegen auf dem Nachweis individueller und damit charakteristischer Peakmuster in den Massenspektren *ohne* die Notwendigkeit, eine Strukturaufklärung oder Identifikation einzelner Signale vornehmen zu müssen.

Erste Publikationen über die Anwendbarkeit der MALDI-TOF MS zur Untersuchung von Pollenkörnern oder deren Extrakten zeigten, dass im Massenbereich unter  $m/z$  2000 häufig Lipide, Oligosaccharide oder Glykoproteine detektiert werden, während im höheren Massenbereich meist Peptid- bzw. Proteinsignale gefunden werden. Beispielsweise beschreiben Liang *et al.* in MALDI-Massenspektren an Pollenextrakten im Bereich unter  $m/z$  1000 den Nachweis von Phospholipid-Molekülen, bestehend aus Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und Diacylglycerol. [256] Die MS/MS Fragmentierungsanalyse einzelner Peakmassen wie  $m/z$  964, 1126, 1150, 1299, in den MALDI-Massenspektren von *Ambrosia trifida*- und *Artemisia absintium*-Pollenextrakten deuteten auf das Vorhandensein von Polysaccharid-Einheiten aus Hexose mit 162 Da, Fructose mit 146 Da und Pentose mit 132

Da. [5] Fraser *et al.* wiesen Carotinoide wie Lycopin,  $\beta$ -Carotine und Zeaxanthin in einem Massenbereich um  $m/z$  550 nach. Sporopollenin, ein Bestandteil der Pollenexine, wurde von Moore *et al.* in *Selaginella pallescens*- und *Lycopodium clavatum* L-Sporen bei Massen von  $m/z$  4400-4800 gefunden. [266]

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass bei der Untersuchung von Pollenkörnern insbesondere der Massenbereich zwischen  $m/z$  1000 und 15000 die für eine Unterscheidung von Spezies wichtigen Peaks aufweist. [3, 5] Daher war es in der vorliegenden Dissertation wichtig, sowohl die instrumentellen als auch experimentellen Bedingungen für diesen Massenbereich zu optimieren. Dieser, im Folgenden beschriebene Optimierungsprozess umfasste sowohl die instrumentellen Einstellungen des Massenspektrometers (wie Laserpulsanzahl, -profil, -intensität und Peak-Suppression) als auch wichtige experimentelle Parameter (wie die Wahl der Matrix und geeigneter Extraktionsverfahren, Probenträger sowie die Probenpräparation).

#### 5.1.1 Optimierung instrumenteller Parameter

##### 5.1.1.1 Akkumulation von Einzel- und Serienspektren

Das MALDI-TOF Prinzip ermöglicht es, mit jedem einzelnen Laserpuls ein Massenspektrum zu erzeugen. Die Ionenausbeute eines solchen Einzelpulsspektrums ist jedoch meist gering. Dementsprechend wird eine Akkumulation von mehreren hundert Einzelpulsspektren durchgeführt, um ein aussagekräftiges Summenspektrum zu erhalten.

Die folgende Abbildung 5-1 verdeutlicht die Veränderung in einem Massenspektrum, wenn auf ein und denselben Probenpunkt sukzessive Laserpulse akkumuliert werden. Während in den ersten drei Summenspektren, 10, 50, 100 Laserpulse, nur Peaks mit geringer Intensität zu erkennen sind, verbessert sich dies ab einer Akkumulation von 500 Laserpulsspektren. Das 500-Pulssummenspektrum dieser *Corylus avellana*-Probe zeigt erstmals deutlich intensive Peaks bei  $m/z$  1801, 2944, 4103 und 9040, sowie ein charakteristisches Peakmuster zwischen  $m/z$  5155-7141, deren Intensität bei weiterer Akkumulation von Spektren bis 1000 oder 2000 Laserpulse nicht mehr wesentlich zunimmt.

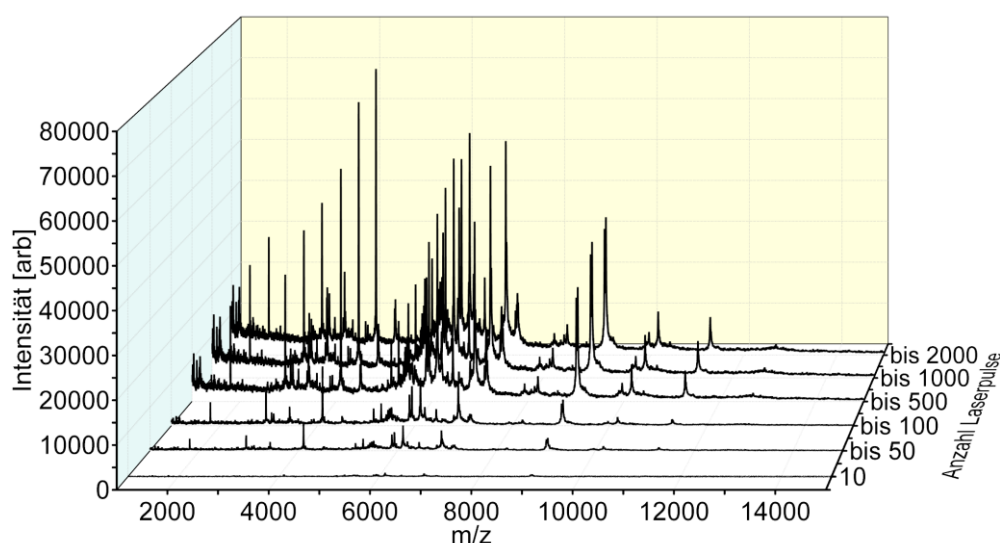
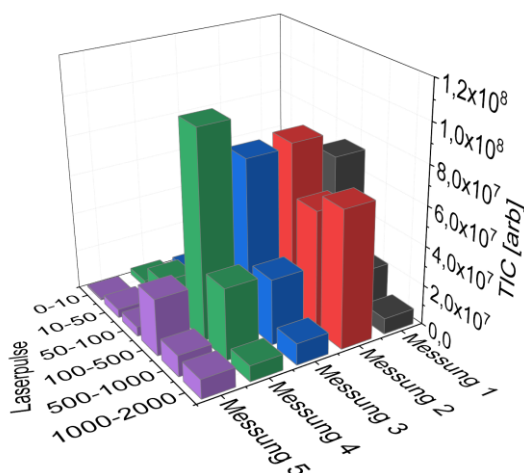


Abbildung 5-1: Summenspektren von *Corylus avellana* nach Akkumulation von 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 Laserpulsen derselben Stelle (MTP 384 Stahlträger, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % Trifluoressigsäure - TFA und 55 % ,medium'-Laserintensität).

Für eine bessere statistische Absicherung wurde diese Untersuchung auf vier weiteren Probenpunkten wiederholt. Zur Darstellung dieser Ergebnisse in Abbildung 5-2 wurde die Summe aller gemessenen Signale in den jeweiligen Spektren in Form des Totalionenstroms (engl. *total ion current*, TIC in *arbitrary units*, arb) verwendet. In Abbildung 5-2 A ist so der TIC für jedes Spektrum dargestellt.

A



B

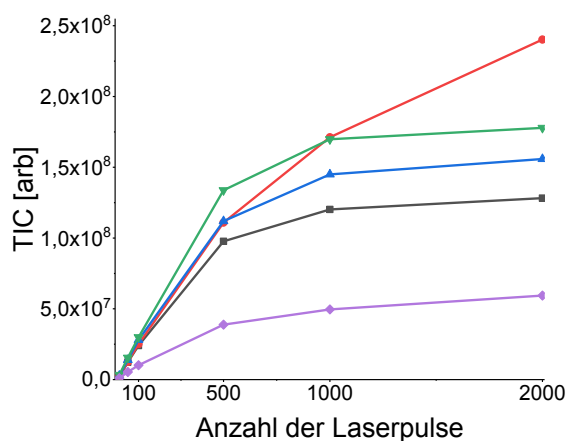


Abbildung 5-2: (A) Totalionenstrom fünf Wiederholungsmessungen bei unterschiedlicher Anzahl aufeinanderfolgenden Laserpulsen/Spektren und (B) Summe des TICs der fünf Messungen nach insgesamt 2000 Laserpulsen (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % ,medium'-Laserintensität).

Es ist zu erkennen, dass bei allen 5 Wiederholungen das Maximum des Totalionenstroms zwischen dem 100-sten und 500-sten Laserpuls gefunden wurde. Die Summe der 5 Balken

einer Messung ist in Abbildung 5-2 B abgebildet. In der überwiegenden Anzahl der Messungen (Abb. 5-2 B, rote Kurve ausgenommen) reduziert sich der Anstieg des TICs ab 500 Laserpulsen deutlich. Da jedoch bei jedem Schritt eine unterschiedliche Anzahl an Laserpulsen, genauer 10, 40, 50, 400, 500 bzw. 1000 Pulse, akkumuliert wurden, ist in Abbildung 5-3 die Ionenausbeute pro Laserpuls aufgetragen. In dieser Abbildung wird sichtbar, dass die normierten TIC-Werte bis zu einer Anzahl von 500 Laserpulsen nahezu gleichbleibend zwischen 200000 und 300000 [arb]/Laserpuls liegen (Abb. 5-3, ersten vier Balken jeder Messung). Bei weiterer Akkumulation auf dem gleichen Punkt (engl. *spot*) nimmt die Ionenausbeute deutlich ab (Abb. 5-3, 500-1000 oder 1000-2000 Laserpulse), da offensichtlich die meisten Analytionen an dieser Stelle bereits abgetragen wurden.

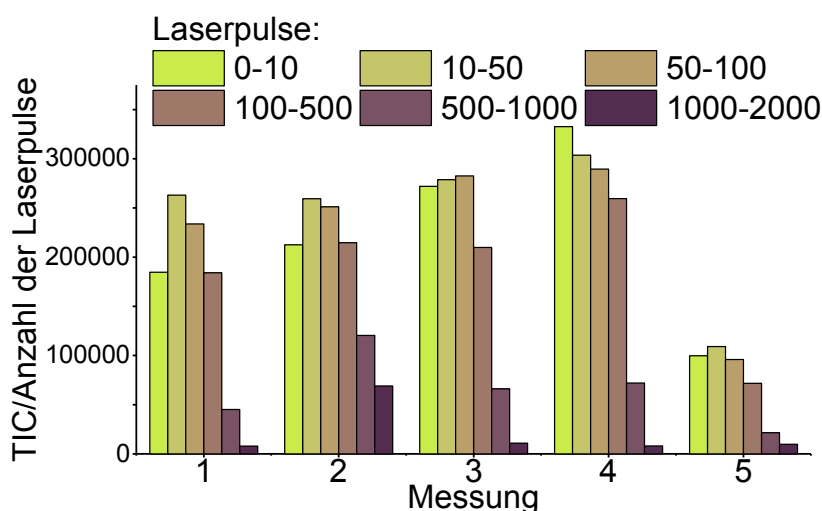


Abbildung 5-3: Totalionenstrom pro Laserpuls bei Akkumulation unterschiedlicher Anzahl von Impulsen (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % ‚medium‘-Laserintensität).

Eine gängige Praxis, die durch die Ablation der Proben nach den ersten 500 Laserpulsen beobachtete Verringerung des TIC zu umgehen, stellt die Akkumulation von Spektren dar, die auf unterschiedlichen Positionen des gleichen Probenspots gemessen werden. In Abbildung 5-4 werden dazu die TIC-Werte von Spektren verglichen, die aus 500 (lila), 1000 (gelb) und 2000 (türkis) Laserpulsen summiert wurden. Diese wurden entweder aus unmittelbar aufeinanderfolgenden Laserpulsen von einer Position oder aus einer unterschiedlichen Anzahl von Laserpulsen von verschiedenen Stellen erzeugt. So kann beispielsweise das Summenspektrum von 500 Laserpulsen aus 500 aufeinanderfolgenden von einer Stelle oder aus jeweils 100 von 5 verschiedenen Stellen, respektive 250 von zwei Stellen akkumuliert werden. Selbiges gilt für die Summen aus den 1000-Puls- und 2000-Puls-Summenspektren, die entweder an einer Stelle als Gesamtspektrum oder in Segmenten von verschiedenen Stellen aufgenommen wurden. Alle diese Varianten wurden darüber



hinaus jeweils 10x wiederholt (Abb. 5-4 A). Die Mittelwerte der Varianten und die Standardabweichungen sind daher in Abb. 5-4 B zu sehen.

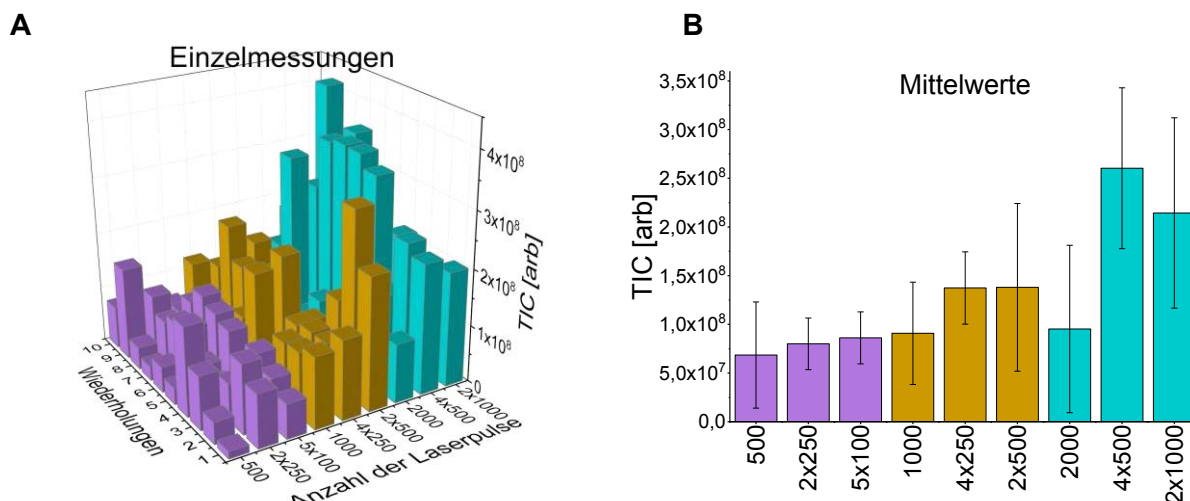


Abbildung 5-4: Verschiedene Varianten der Einzelspektren-Akkumulation, d.h. gleiche Farbe – gleiche Summe von Laserpulsen. In (A) sind die TIC-Werte der Spektren bei 10 Wiederholungen dargestellt und in (B) ist der Mittelwert der Varianten mit Standardabweichung zu sehen (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % „medium“-Laserintensität).

Die in Abb. 5-4 B dargestellten Mittelwerte der TICs bestätigen die zuvor bereits beschriebene geringe Zunahme der Ionenausbeute nach den ersten 500 Laserpulsen auf eine Stelle. Denn weitere Messungen mit jeweils 1000 oder 2000 Laserpulsen auf einem Punkt führen lediglich zu einem geringen Anstieg des TIC (siehe Abb. 5-4 B, Balken bei 500, 1000 und 2000 Laserpulsen).

Im Unterschied dazu wird ein Anstieg in den TIC-Werten erst bei Positionswechsel und anschließender Akkumulation sichtbar (vergleiche 2000 mit 4x500 oder 2x1000 Laserpulse). Hier zeigte sich, dass der Wechsel der Position nach jeweils 500 Laserpulsen zum größten Anstieg des TIC führte (Abb. 5-4 B, 4x500). Die Standardabweichung aus 10 Wiederholungen (Abb. 5-4 A) ist jedoch verhältnismäßig groß. Dies deutet auf ein weiteres Problem der MALDI-TOF MS Methode hin, das in der Inhomogenität der Probepräparation bei Verwendung der Tropfenmethode begründet liegt.

Bei einem genauen Blick auf drei ausgewählte Mittelwerts-Spektren (Abb. 5-5) aus dieser Serie, generiert aus 500-, 2x500- und 4x500-Einzelpulsspektren, ist deutlich erkennbar, dass sich die maximalen Intensitäten vervielfachen, das Signal-Rausch(S/N)-Verhältnis dabei aber nicht verbessert wurde. Bei 500 Laserpulsen liegt z.B. die Intensität des Peaks  $m/z$  4103 bei 26612,8 [arb], bei 2x500 Laserpulsen bei 43149,5 [arb] und bei 4x500 Laserpulsen bei 92059,4 [arb]. Das Rauschen, berechnet als gemittelt Integral über die dreifache Peakbreite in einem Bereich ohne Signale z.B. ab  $m/z$  12000, beträgt 878,3 [arb] (bei 500),

1438,3 [arb] (bei 2x500) und 2384,9 [arb] (bei 4x500 Laserpulsen). Da sich sowohl das Signal als auch das Rauschen proportional zueinander erhöhen, kann in diesem Fall durch den mehrfachen Positionswechsel und anschließender Akkumulation keine signifikante Verbesserung der Spektren erzielt werden.

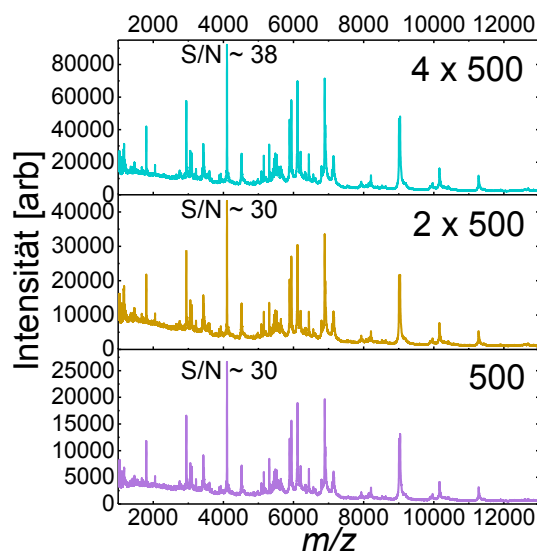


Abbildung 5-5: Drei ausgewählte Mittelwerts-Spektren der in Abb. 5-4 dargestellten TIC-Balken bei 500, 2x500 und 4x500 Laserpulsen (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 %-medium-Laserintensität).

Trotzdem bietet der häufige Wechsel der Messposition auf dem Probenpunkt die Möglichkeit, den zuvor beschriebenen Effekt der Probeninhomogenität wenigstens teilweise zu kompensieren. Im sogenannten engl. *random walk*-Modus des Massenspektrometers werden zur Aufnahme eines Summenspektrums, jeweils 10 Laserpulse an zufälligen Stellen des Spots mit einem Durchmesser von 2 mm akkumuliert. Abbildung 5-6 illustriert dazu die im Gegensatz zum vorangegangenen Datensatz (ohne *random walk*, Abb. 5-4 B) geringeren Standardabweichungen der 10 Wiederholungen. Die Ergebnisse aus Abbildung 5-6 zeigen jedoch auch, dass die vierfache Akkumulation von jeweils 500-Pulse-Spektren an verschiedenen Positionen eines Spots keinen Vorteil zur Akkumulation von 2000-Einzelspektren im *random walk*-Modus bietet (vergleiche Abb. 5-6 TIC Werte von 2000 Laserpulsen mit 4x500 Laserpulsen).

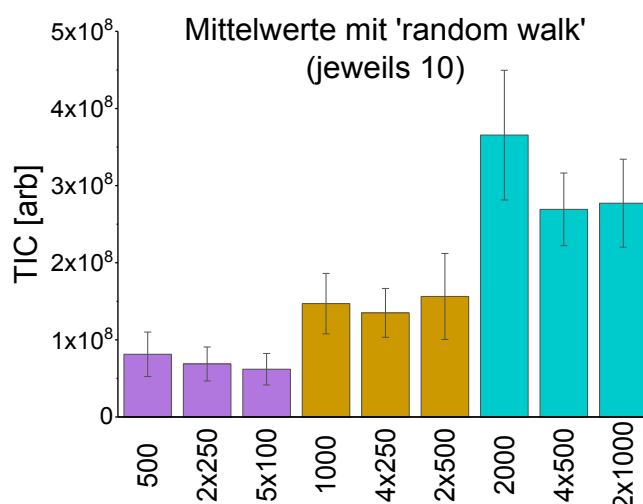


Abbildung 5-6: Verschiedene Varianten der Einzelspektren-Akkumulation, d.h. gleiche Farbe – gleiche Summe von Laserpulsen. Dargestellt sind die TIC-Mittelwerte der Spektren bei 10 Wiederholungen gemessen im *random walk*-Modus (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % medium-Laserintensität).

Aus diesen Versuchen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

Die Akkumulation von Laserpulsen zur Erzeugung eines Spektrums ist essentiell. Allerdings gilt hier nicht das Prinzip „viel hilft viel“, da ab einer bestimmten Anzahl von Laserpulsen (ca. 500), die Zunahme des TIC stagniert. Die Messungen im *random walk*-Modus verbessern deutlich die Reproduzierbarkeit der Spektren. Dabei ist es jedoch unerheblich, ob die Akkumulation der Einzelspektren an verschiedenen Positionen oder in Summe durchgeführt wird.

#### 5.1.1.2 Proximity-Untersuchung der Analyten eines MS-Pollenspektrums

Der verwendete BioTyping-Ansatz ermöglicht es, eine Differenzierung von Spektren an Hand von Mustern vorzunehmen. Dabei werden keinerlei Informationen über chemische Strukturen in der Probe benötigt. Dessen ungeachtet wäre es interessant, wenigstens ansatzweise Aufschluss über die Zusammensetzung der aus den Pollenkörnern extrahierten Verbindungen zu gewinnen. Dazu wurde ein Proximity-Ansatz entwickelt, der es gestattet, Zusammenhänge aus den Peaks der untersuchten Pollenkörner zu finden und zu bestimmen. Dieser wird exemplarisch an Hand des *C. avellana* Mittelwerts-Spektrums aus Abb. 5-5, mit 500 Laserpulse demonstriert. Bei Verwendung einer `findpeaks`-Matlab-Funktion [305] bei 'MinPeakProminence' von 1500 wurden in diesem Spektrum insgesamt 42 Peaks erkannt. Basierend auf diesen 42 Peaks wurde die in Abbildung 5-8 gezeigte Proximity-Matrix generiert. Darin sind die Abstände in Da aller 42 Peaks zueinander angeordnet. In einer ersten Analyse wurden gleiche Werte gesucht. Werden bestimmte Massendifferenzen häufiger gefunden, sind diese Werte hervorgehoben und

unterstrichen. Insgesamt ergeben sich dabei nur 48 Paare, mit Abständen von 17 bis 5642 Da. Zudem gibt es keine Massendifferenz, die mehr als zwei Mal vorkommt. Dies spricht dafür, dass keine regelmäßigen Wiederholeinheiten von irgendeinem der Analyten abgespalten wurden. Derartige konstitutionelle Repetiereinheiten werden typischerweise bei der Messung von synthetischen Polymeren gefunden.

Darüber hinaus enthält die Proximity-Matrix aus Abb. 5-8 acht Massen, umrandet hervorgehoben, die jeweils dem halben Wert einer anderen Masse entsprachen. Hier ist davon auszugehen, dass es sich um die jeweiligen doppelt-geladenen Ionen  $[M+2H]^{2+}$  handelt. In Abbildung 5-7 ist dazu noch einmal genauer das Spektrum aus Abb. 5-5 illustriert. Die 42 Peaks sind eingezeichnet und die acht Paarungen farblich markiert. Da der jeweils zweite Peak, also der einfach geladene Analyt  $[M+H]^+$  dieser Kombinationen höhere Intensitäten aufweist als der Erste, bestätigt diesen Zusammenhang. Denn doppelt-geladene Ionen sind im MALDI-TOF MS generell schwer detektierbar. [129, 161]

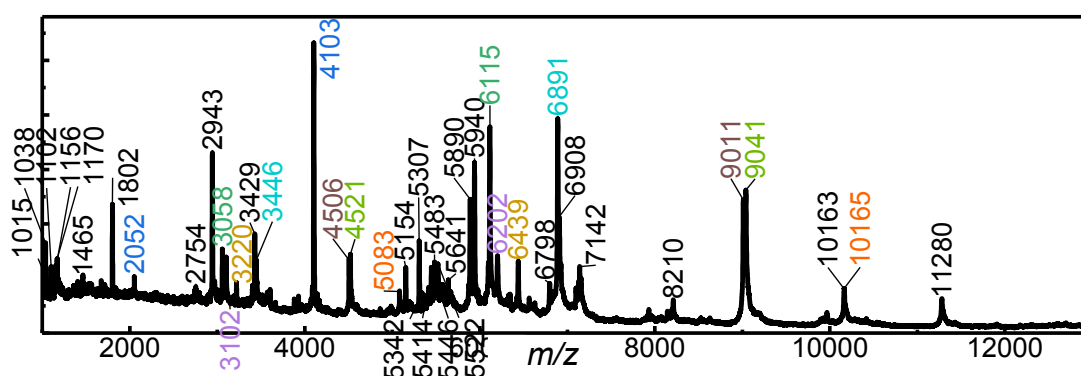


Abbildung 5-7: Mittelwerts-Spektrum der *C. avellana*-Pollenprobe aus Abb. 5-5 hier gezeigt mit 42 ausgewählten Peaks, während die doppelt  $[M+2H]^{2+}$  und einfach  $[M+H]^+$ -geladenen Analyte-Kombinationen jeweils farblich identisch gekennzeichnet sind.

Auch das Vorhandensein bestimmter ubiquitärer Addukte wie Alkali-, Ammonium- oder HCCA-Analyt-Kombination lässt sich nur an Hand weniger Werte bestätigen. So ist der Abstand von 17 Da, als Differenz zwischen protonierten  $[M+H]^+$  und dem Ammonium-Addukt:  $[M+NH_4]^+$ , nur zwischen den Peaks mit  $m/z$  3429 und 3446, sowie zwischen  $m/z$  6891 und 6908 zu finden. Die Massendifferenz, die der Matrixsubstanz HCCA mit 189,17 Da entspricht, zeigt sich einzig zwischen den Peaks mit den  $m/z$ -Werten 2754 und 2943. Charakteristische Massendifferenzen von  $[M-H]^+$  zu  $[M+Na]^+$  mit 22 Da oder zu  $[M+K]^+$  mit 38 Da bzw.  $[M+Na]^+$  zu  $[M+K]^+$  mit 16 Da sind aus dieser Abbildung nicht zu entnehmen. Vermutlich liegen die 42 Analyten hauptsächlich protoniert vor. [306, 307]

1015	1038	1102	1156	1170	1465	1802	2052	2754	2943	3068	3102	3220	3429	3446	4103	4506	4521	5083	5154	5307	5342	5414	5446	5483	5522	5541	5590	5940	6115	6202	6439	6798	6808	7142	8210	9041	10163	10165	11280		
0	23	87	141	155	450	787	1037	1739	1928	2043	2087	2205	2414	2431	3008	3481	3508	4008	4139	4292	4327	4399	4431	4468	4507	4626	4875	4825	5100	5187	5424	5783	5878	5953	6127	7195	7996	8026	9146	9150	10265
0	64	118	132	427	764	1014	1716	1905	2020	2064	2182	2381	2408	3005	3468	3463	4048	4116	4269	4304	4376	4408	4449	4464	4603	4652	4802	5073	5100	5337	5696	5769	5806	6040	7104	7172	7973	8003	9125	9127	10242
0	54	68	363	700	950	1641	1956	2000	2118	2327	2344	3001	3404	3419	3981	4052	4205	4240	4312	4344	4361	4420	4539	4788	4838	5073	5100	5337	5696	5769	5806	6040	7108	7970	7939	9016	9063	10107	10242	10243	
0	14	309	646	896	1598	1787	1902	1946	2064	2273	2290	2942	3350	3365	3827	3998	4151	4186	4298	4270	4327	4366	4465	4734	4764	4959	5046	5268	5642	5735	5732	5986	7054	7855	7885	9007	9009	10124	10242	10243	
0	295	632	882	1584	1773	1888	1932	2050	2259	2276	2393	3336	3351	3813	3994	4137	4172	4244	4270	4327	4471	4720	4770	4945	5032	5268	5628	5721	5736	5972	7040	7841	7871	8893	8995	10170	10242	10243	10244		
0	337	587	1289	1478	1593	1637	1755	1964	1981	2638	3041	3056	3618	3659	3842	3947	4057	4176	4425	4475	4650	4737	4874	5333	5426	5443	5677	6745	7546	7576	8688	8700	9815	10086	10163	10165	11280				
0	250	952	1141	1256	1300	1418	1627	1644	2301	2704	2719	3281	3332	3505	3540	3612	3644	3681	3720	3839	4088	4138	4313	4400	4637	4996	5089	5106	5340	6408	7209	7239	8361	8363	9478	9480	10163	10165	11280		
0	702	891	1006	1050	1168	1377	1394	2454	2469	3031	3102	3255	3290	3362	3394	3431	3470	3569	3838	3888	4063	4150	4387	4746	4839	4856	5089	5106	5340	6158	6959	6989	8111	8113	9228	9230	10163	10165	11280		
0	1181	1304	348	466	675	692	1349	1752	1767	2329	2400	2553	2588	2692	2729	2768	2887	3136	3186	3361	3448	3685	4044	4137	4154	4388	5456	6257	6287	7409	7411	8326	8328	9228	9230	10163	10165	11280			
0	115	159	277	486	503	1160	1563	1578	2140	2211	2364	2399	2471	2503	2540	2579	2688	2947	3297	3259	3496	3855	3948	3965	4199	6267	6068	6068	7220	7107	8222	8224	9228	9230	10163	10165	11280				
0	44	162	371	388	1045	1448	1463	2025	2096	2249	2284	2356	2388	2425	2464	2583	2832	2882	3057	3144	3381	3740	3833	3850	4084	6152	5953	5983	7105	7107	8222	8224	9228	9230	10163	10165	11280				
0	209	226	883	1286	1301	1863	1934	2087	2122	2194	2226	2263	2302	2421	2670	2720	2895	2982	3219	3578	3671	3688	3922	4090	5791	5821	6943	6945	8060	8062	9173	9175	10265	10267	10268	10269	10270				
0	674	1077	1092	1654	1725	1878	1915	1964	2017	2054	2083	2241	2461	2511	2686	2741	2866	2962	3352	3345	3462	3696	4754	5565	5565	6717	6719	7834	7836	8947	8949	10058	10060	10062	10064	10066	10068	10069	10070		
0	657	1060	1075	1637	1708	1861	1896	1988	2000	2037	2076	2105	2444	2454	2669	2756	2903	3352	3345	3462	3696	4754	5565	5565	6717	6719	7834	7836	8947	8949	10058	10060	10062	10064	10066	10068	10069	10070			
0	403	418	950	1051	1204	1239	1311	1343	1380	1419	1538	1787	1837	2012	2099	2238	2695	2768	2808	2939	3104	3450	3509	3639	4107	4808	4936	6062	7177	7179	8298	8300	9409	9411	10518	10520	10521	10522			
0	75	577	648	801	836	908	940	977	1016	1135	1364	1434	1609	1636	1933	2292	2385	2402	2636	3104	4503	4535	5657	5659	6774	6776	7891	7893	9002	9004	10111	10113	10115	10117	10119	10121	10123	10124			
0	562	633	786	821	893	925	962	1001	1120	1359	1419	1594	1681	1918	2277	2370	2387	2621	3509	4490	4520	5642	5644	6759	6761	7876	7878	9005	9007	10118	10120	10122	10124	10126	10128	10130	10131				
0	71	224	259	331	363	400	439	558	807	857	1032	1119	1366	1715	1808	1825	2059	3127	3928	3958	5080	5082	6197	6199	7312	7314	8427	8429	9540	9542	10651	10653	10655	10657	10659	10661	10662	10663			
0	153	188	260	292	329	368	487	736	786	961	1048	1265	1644	1737	1754	1988	3056	3857	3887	5009	5011	6126	6128	7241	7243	8354	8356	9467	9469	10578	10580	10582	10584	10586	10588	10590	10591	10592			
0	35	107	139	176	215	334	583	633	808	895	1132	1491	1584	1737	1754	1988	3056	3857	3887	5009	5011	6126	6128	7241	7243	8354	8356	9467	9469	10578	10580	10582	10584	10586	10588	10590	10591	10592			
0	72	104	141	160	299	546	598	773	860	1097	1456	1549	1660	2688	3669	3689	4621	4623	5638	5640	6653	6655	7668	7670	8683	8685	9696	9698	10707	10709	10711	10713	10715	10717	10719	10721	10723	10725			
0	32	69	108	227	476	526	701	788	1025	1384	1477	1494	1728	2786	3697	3627	4749	4751	5866	5868	6881	6883	7894	7896	8907	8909	9918	9920	10927	10929	10931	10933	10935	10937	10939	10941	10943	10945			
0	37	76	195	444	494	669	756	993	1352	1445	1462	1696	2764	3565	3565	4717	4719	5834	5836	6847	6849	7860	7862	8871	8873	9882	9884	10891	10893	10895	10897	10899	10901	10903	10905	10907	10909	10911			
0	39	158	407	457	632	719	956	1315	1408	1425	1659	2727	3528	3558	4680	4682	5797	5799	6810	6812	7821	7823	8832	8834	9843	9845	10852	10854	10856	10858	10860	10862	10864	10866	10868	10870	10872	10874			
0	119	368	418	593	680	917	1276	1369	1386	1620	2688	3489	3519	4641	4643	5758	5760	6869	6871	7880	7882	8891	8893	9900	9902	10909	10911	10913	10915	10917	10919	10921	10923	10925	10927	10929	10931	10933			
0	249	299	474	561	798	1157	1250	1267	1501	2569	3370	3400	4522	4524	5539	5541	6550	6552	7561	7563	8570	8572	9579	9581	10588	10590	10592	10594	10596	10598	10600	10602	10604	10606	10608	10610	10612	10614			
0	50	225	312	549	908	1001	1018	1252	2320	3121	3151	4273	4275	5340	5342	6351	6353	7362	7364	8371	8373	9380	9382	10389	10391	10393	10395	10397	10399	10401	10403	10405	10407	10409	10411	10413	10415	10417			
0	175	282	499	858	951	968	1202	2270	3071	3101	4223	4225	5340	5342	6351	6353	7362	7364	8371	8373	9380	9382	10389	10391	10393	10395	10397	10399	10401	10403	10405	10407	10409	10411	10413	10415	10417	10419			
0	237	596	689	706	940	2008	2809	2839	3961	3963	5078	5080	6089	6091	7108	7110	8117	8119	9126	9128	10135	10137	10139	10141	10143	10145	10147	10149	10151	10153	10155	10157	10159	10161	10163	10165	10167				
0	359	452	469	703	1771	2572	2602	3724	3726	4481	4483	5237	5239	6001	6003	6763	6765	7523	7525	8283	8285	9043	9045	9801	9803	10559	10561	10563	10565	10567	10569	10571	10573	10575	10577	10579	10581				
0	93	110	344	1412	2213	2243	3355	3367	4482	4484	5237	5239	6001	6003	6763	6765	7523	7525	8283	8285	9043	9045	9801	9803	10559	10561	10563	10565	10567	10569	10571	10573	10575	10577	10579	10581	10583	10585			
0	17	251	1319	2120	2150	3272	3274	4389	4391	5141	5143	6150	6152	7159	7161	8166	8168	9173	9175	10180	10182	10184	10186	10188	10190	10192	10194	10196	10198	10200	10202	10204	10206	10208	10210	10212	10214	10216			
0	234	1302	2103	2133	3255	3257	4372	4374	5141	5143	6150	6152	7159	7161	8166	8168	9173	9175	10180	10182	10184	10186	10188	10190	10192	10194	10196	10198	10200	10202	10204	10206	10208	10210	10212	10214	10216	10218			
0	1068	1869	1899	3021	3023	4138	4140	4999	5001	6006	6008	7013	7015	8020	8022	9025	9027	10030	10032	10034	10036	10038	10040	10042	10044																

Abbildung 5-8: Proximity-Matrix von 42 Peaks aus dem *C. avellana*-Probenspektrum aus Abb. 5-5, gleiche  $\Delta m/z$ -Werte sind unterstrichen und hervorgehoben. Mögliche doppelt geladene Analyten  $[M+2H]^{2+}$  sind umrandet.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Massen des *C. avellana*-Mittelwerts-Spektrums eine heterogene Zusammensetzung aus verschiedensten Biopolymeren

widerspiegeln. Lediglich die MS/MS-Fraktionierungsanalytik einzelner Peaks könnte anhand von Fragmenten und typischen Wiederholeinheiten eine Bestimmung von einzelnen Analyten gestatten. Auf Grund von instrumentellen Limitierungen war die Fragmentierung von Ionen mit Massen über  $m/z$  3000, die in den Pollenspektren die Mehrheit darstellen, mit dem verwendeten MALDI-Instrument nicht möglich. Eine genauere Analyse solcher molekularer Klassifikatoren wie z.B. Glykane, Lipide, Peptide und Proteine würde zusätzliche biochemische Analysen und den Einsatz von LC-MS/MS-Techniken erfordern.

### 5.1.1.3 Analyse des Zusammenhangs aus Laserprofil und Laserintensität

Ein weiterer, bedeutsamer Parameter betrifft das Laserstrahlprofil und die Laserenergie, die in die Probe eingebracht werden. Wie bereits im theoretischen Teil beschrieben, verwendet das in dieser Arbeit genutzte Massenspektrometer einen Mehrpunkt-Laser, dessen Spotgröße von der Fokusebene abhängt. Wie in Abbildung 5-9 schematisch dargestellt, gibt es 5 Einstellungen, ultra, large, medium, small, mini, die alle mit einer Laserintensität zwischen 0 und 100 Prozent ausgewählt werden können. Die Laserspotgröße beträgt, abhängig von der entsprechenden Einstellung, zwischen maximal 90  $\mu\text{m}$  und minimal 10  $\mu\text{m}$ .

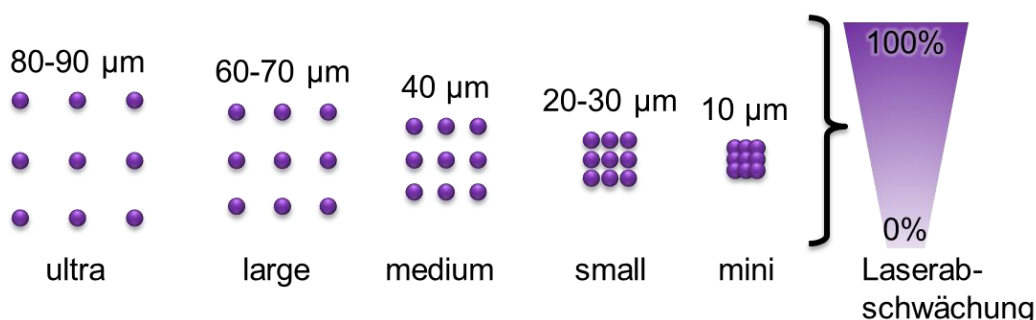


Abbildung 5-9: Schematische Darstellung des Mehrpunkt-Laserprofils bei den möglichen 5 Einstellungen des Smartbeam-Lasers.

In Abbildung 5-10 ist der gemittelte TIC von jeweils 10 Spektren mit je 1000 Laserpulsen pro Spektrum bei diesen 5 Lasereinstellungen unter Verwendung des *random walk*-Modus dargestellt. Dabei fällt zunächst auf, dass es keinen linearen Zusammenhang von Signalintensität und Laserintensität gibt. Erst bei einer Laserintensität von 30-40 Prozent zeigen sich deutlich steigende Signalintensitäten. Dabei handelt es sich um die sogenannte Schwellenenergie, bei der erste Signale detektiert werden können.

Zwischen der maximalen Signalintensität und dem Laserprofil gibt es jedoch keinen klaren Zusammenhang. So nimmt die Intensität in der Reihenfolge ultra > large > mini > medium > small zu (Abb. 5-10, 90 %), was im Gegensatz zur Laserspotgröße steht. Die Ergebnisse zeigen, dass für die untersuchte *C. avellana*-Pollenprobe der Laserfokus small und medium

eine gute Kombination aus Laserfokus und Signalintensität darstellen. Bei zu kleinem Fokus (mini) ist die vom Laser erfasste Menge an Analyten zu gering, während bei zu großem Fokus (ultra) die pro Fläche eingestrahlte Laserenergie ( $\text{W } \mu\text{m}^{-2}$ ) zu gering ist. Aus dieser Untersuchung leitete sich für die zukünftigen Messungen ab, Pollenkörner in homogenen Probenpunkten mit der Laserspoteinstellung small und in inhomogenen Probenpunkten mit medium zu messen. Die maximale Laserenergie sollte dabei zwischen 50-70 Prozent betragen, um die Gefahr unerwünschter Fragmentierung und der damit verbundenen Diskriminierung von labilen Analyten zu vermeiden.

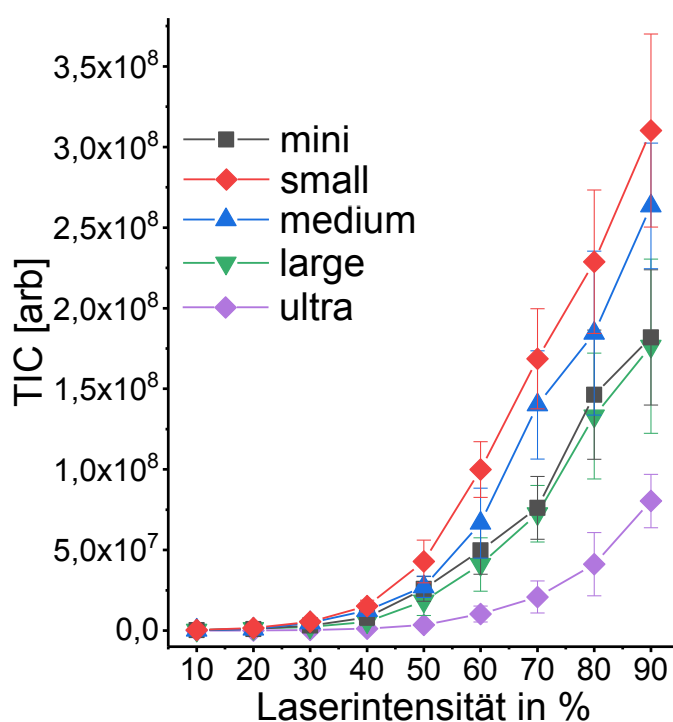


Abbildung 5-10: Messung des Einflusses der Laserintensität, von 0-100 %, und Laserspotgröße, von mini < small < medium < large < ultra, auf die Summe der Signale (TIC) von je 10 Spektren pro gezeigtem Datenpunkt.

#### 5.1.1.4 Variation in der Einstellung der Matrix-Suppression

Ein weiterer Geräteparameter des MALDI-Instruments stellt die Möglichkeit zur Matrix-Suppression dar. Damit werden die niedermolekularen, organischen Matrixmoleküle ausgeblendet, die in einem 100- bis 100000-fachen molaren Überschuss zum Analyten vorliegen und zu einer Detektorsättigung führen können. Diese Suppression kann auf zweierlei Wegen erfolgen: Zum einen können die gebildeten Ionen auf dem Weg zum Detektor elektrisch an die Flugrohrwand abgelenkt werden, sodass sie den Detektor nicht erreichen (engl. *deflection*). Die andere Methode besteht darin, den Detektor erst nach dem Auftreffen der kleinen Ionen anzuschalten (engl. *gating*). [161, 308]

Für das folgende Experiment wurde der Bereich der Matrix-Ionen in zwei verschiedenen Segmenten abgetrennt. So erfolgte die Suppression jeweils der Bereiche unter  $m/z$  900 bzw. 600 sowohl im Gating- als auch im Deflection-Modus.

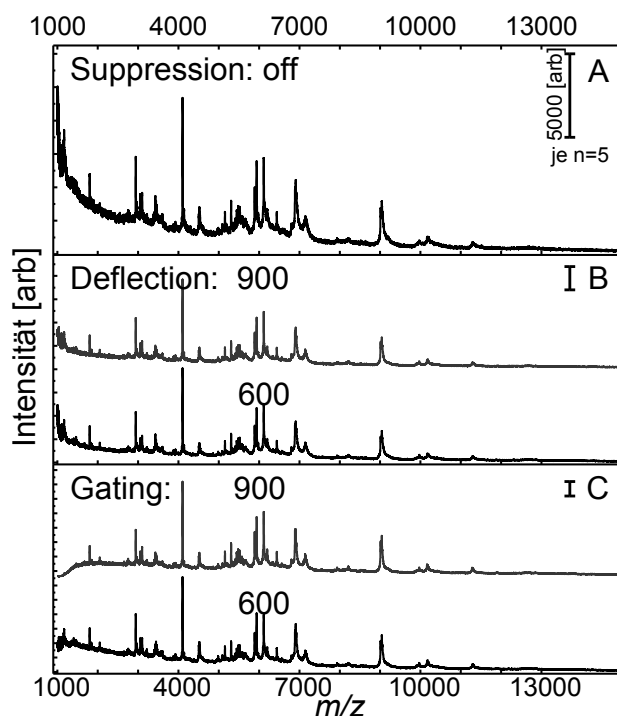


Abbildung 5-11: Mittelwerts-Spektren der *C. avellana*-Pollenprobe in Abhängigkeit vom verwendeten Matrix-Suppression-Modus: (A) off, (B) deflection und (C) gating (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % „medium“-Laserintensität mit *random walk* bei 1000 Laserpulsen pro Spektrum).

Ohne Suppression ist der Bereich um  $m/z$  1000 durch einen starken Anstieg der Grundlinie gekennzeichnet (siehe Abb. 5-11 A). Die Änderungen bei Anwendung des Deflection- bzw. des Gating-Modus sind darunter dargestellt (Abb. 5-11 B/C). In beiden Suppressionsmodi sind Verbesserungen festzustellen. Diese sind in einer flacheren Grundlinie und generell etwas höheren Peak-Intensitäten sichtbar. An der Struktur des Spektrums, wie z.B. der Anzahl der Peaks oder dem Intensitätsverhältnis untereinander ändert sich jedoch nur wenig. Bei zu spätem Gating (ab  $m/z$  900, Abb. 5-11 C) besteht die Gefahr, im niedrigen Massenbereich zu viele Ionen auszublenzen. Dies ist ansatzweise am Beginn der Grundlinie ( $m/z$  1000-1200, Abb. 5-11 C) zu sehen. Aus diesen Experimenten wurde für die späteren Messungen abgeleitet, dass insbesondere der Deflection-Modus bei Ausblendung der Ionen unter  $m/z$  600 geeignet scheint (Abb. 5-11 B).



### 5.1.2 Optimierung experimenteller Parameter

#### 5.1.2.1 Variation der Matrixsubstanzen

Wie bereits im theoretischen Teil beschrieben und teilweise in Tabelle 2-1 aufgelistet, existieren über 100 verschiedene Matrixsubstanzen. In der Literatur werden unterschiedlichste Matrices für die Messung spezieller Stoffklassen beschrieben. So werden u. a. 3-(Indol-3-yl)-acrylsäure (IAA) für Peptide,  $\alpha$ -Cyano-5-hydroxyzimtsäure (4-HCCA) für Proteine und 3-Aminochinolin (3-AQ) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) für Kohlenhydrate verwendet.

Da jedoch die genaue Struktur der aus den Pollenkörnern gelösten Bestandteile nicht bekannt ist, fiel die Wahl für die im folgende untersuchten Matrices auf diese 6 Substanzen:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (4-HCCA), 2-(4-Hydroxyphenyl-azo)benzoesäure (HABA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 3-(Indol-3-yl)acrylsäure (IAA), trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (SA) und 3-Aminochinolin (3-AQ). In der Tabelle 5-1 sind die Löslichkeiten dieser Matrices bei einer gängigen Konzentration von  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  in 7 verschiedenen Lösungsmitteln (LSM) bei zwei verschiedenen Bearbeitungsschritten zusammengefasst. Fast alle Matrices lösten sich gut in Aceton (grün markiert). Bei Verwendung der anderen Lösemittel fiel die gute Löslichkeit von DHB und 3-AQ auf (ebenfalls grün). Die meisten Matrixrückstände, die nach separatem Vortexen noch zu beobachten waren, lösten sich unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades auf (hellgrün). Lediglich die in der Tabelle rot hinterlegten Matrix-LSM-Kombinationen (Tab. 5-1, Spalte 1, 2, 4/Zeile 1, 2) ergaben keine klaren Lösungen.

Weit wichtiger als die Löslichkeit waren jedoch die Auswirkungen der Matrix-LSM-Kombination auf die Desorption und Ionisation der Analyten der Probe. Die 42 Matrix-Lösemittel-Varianten wurden daraufhin auf Probenpunkte aufgetragen, auf denen zuvor bereits eine möglichst gleiche Anzahl an Pollenkörnern (*C. avellana*) mit  $1 \text{ }\mu\text{l}$  Ameisensäure extrahiert wurden.

Tabelle 5-1: Löslichkeit von 6 Matrixsubstanzen in 7 Lösungsmitteln unter Anwendung zweier Bearbeitungsschritte, 1.Vortexmischer/rote Schriftfarbe; 2.Ultraschallbad/blau Schriftfarbe, evaluiert mit einer sechsstufigen Skala von - - - bis + + +.

		Löslichkeit (bei 1 mg/100 µl Einwaage) Matrixsubstanz					
	1. Vortex	2. Ultraschall					
		HCCA	HABA	DHB	IAA	SA	3-AQ
LSM	H <sub>2</sub> O:Methanol (v/v)	- - - - -	- +	+ + +	- - - - -	- - - + +	+ + +
	H <sub>2</sub> O:Ethanol (v/v)	- - - -	- - - -	+ + + + +	- - - -	- - + + +	+ + +
	H <sub>2</sub> O:Acetonitril (v/v)	- - - + + +	- - - +	+ + +	- - + +	- + + +	+ + +
	H <sub>2</sub> O:Acetonitril (mit TFA)	- - - + + +	- - - + +	+ + +	- + + +	+ + + +	+ + +
	Methanol	- - - + + +	- - - + + +	+ + +	- + + +	- - + + +	+ + +
	Isopropanol	- - - +	- - - +	+ + + + +	- - - + + +	- - - + +	+ + + +
	Aceton	- - - + + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + + + +	+ + +

Die optische Betrachtung vor Aufnahme der Spektren (Lasereinstellung, 500 Laserpulse, medium 55 %) ergab, dass auf den Probenpunkten, die bei Verwendung leicht flüchtiger Lösungsmittel entstanden, mittig keine Matrixkristalle und außen kristalline Ringe erkennbar waren. In diesen Fällen mit Methanol, Isopropanol und Aceton war es unmöglich Spektren zu messen, da die Ionisierbarkeit der Analyten unter anderem vom molaren Verhältnis zwischen Matrix und Analyten abhängt. Dieses war weder in der Spotmitte mit zu wenig Matrix noch am kristallinen Rand mit zu viel Matrix gegeben. Dagegen konnte auf den Punkten, die bei Verwendung der vier wasserhaltigen Lösungsmittel gebildet wurden, Spektren aufgenommen werden. Zur Auswertung der gemessenen Spektren wurde, in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Beinhauer [85], eine `findpeaks`-Matlab-Funktion definiert. Diese enthielt die Argumente 'MinPeakDistance' von 200 *m/z* und 'MinPeakProminence' von mindestens 2000. Die Anzahl der mit dieser Funktion ermittelten Peaks von 24 Spektren ist in Tabelle 5-2 zusammengefasst. Die Verwendung von HCCA, obwohl erst nach Ultraschallbehandlung löslich, ergab die größte Anzahl an detektierten Peaks im MALDI-Spektrum (Tab. 5-2, Spalte 1). Eine ähnlich große Anzahl an Peaks konnten bei Verwendung von HABA und IAA berechnet werden (Tab. 5-2, Spalte 2 und 4).

Tabelle 5-2: Anzahl der Peaks aus den Spektren, die nach Auftragung der jeweiligen LSM-Matrix-Kombinationen gemessen wurden. Umrandete Werte wurden in Abb. 5-12 eingezeichnet in ihren jeweiligen Spektren gezeigt.

Anzahl der Peaks im Spektrum		HCCA	HABA	DHB	IAA	SA	3-AQ
LSM	H <sub>2</sub> O:Methanol (v/v)	29	4	0	18	0	1
	H <sub>2</sub> O:Ethanol (v/v)	29	14	0	26	0	1
	H <sub>2</sub> O:Acetonitril (v/v)	32	19	0	13	1	4
	H <sub>2</sub> O:Acetonitril (mit TFA)	32	20	0	7	13	7

Bei näherer Betrachtung des mit HABA bei Verwendung von H<sub>2</sub>O:ACN aufgenommenen Spektrums (Abb. 5-12 B) und der Anzahl der daraus ermittelten Peaks zeigte sich jedoch, dass der gewählte Parameter 'MinPeakProminence' = 2000 zu empfindlich war und in einem Spektrum ohne signifikante Peaks ein Großteil des Rauschens als Peaks erkannt wurde. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung von HCCA mit diesem LSM zu einem Spektrum mit intensiven Signalen mit deutlichen Peakmustern bei geringem Rauschen (Abb. 5-12 A). Die Matrices IAA und SA ergaben Spektren (Abb. 5-12 C/D) mit vielen Signalen bei ca. 40-fach geringerer Intensität, weniger Mustern und deutlicherem Rauschen. Für diese 3 Matrices scheint die Auswertung mit der gewählten Matlab-Funktion plausibel. Die Erhöhung des Wertes für den 'MinPeakProminence' Parameter würde allerdings dazu führen, dass ein Großteil der Peaks in den IAA und SA Spektren nicht mehr erkannt wird.

Die gute Eignung der HCCA Matrix stimmt mit anderen Referenzen überein, die für wasserlösliche Proteine eine wässrige Mischung aus HCCA und 50 % ACN unter Zugabe von 0,1 % Trifluoressigsäure (engl. *trifluoroacetic acid*, TFA) empfehlen. Eine ähnliche Kombination mit einer wässrigen Lösung von HCCA und 70 % ACN (0,1 % TFA) wurde für die Untersuchung von Peptiden beschrieben, während für hydrophobe Proteine zusätzlich zur HCCA Matrix noch die Zugabe von 1-30 % Ameisensäure empfohlen wird. DHB (mit 0,1 % TFA, 30-50 % ACN) wird in vielen Literaturstellen häufig zur Messung von Glykoproteinen und Glykopeptiden im Massenbereich um und unter  $m/z$  1000 verwendet. [309] Insofern ist die in Tabelle 5-2 gefundene schlechte Eignung von DHB zur Messung höherer Massen verständlich.

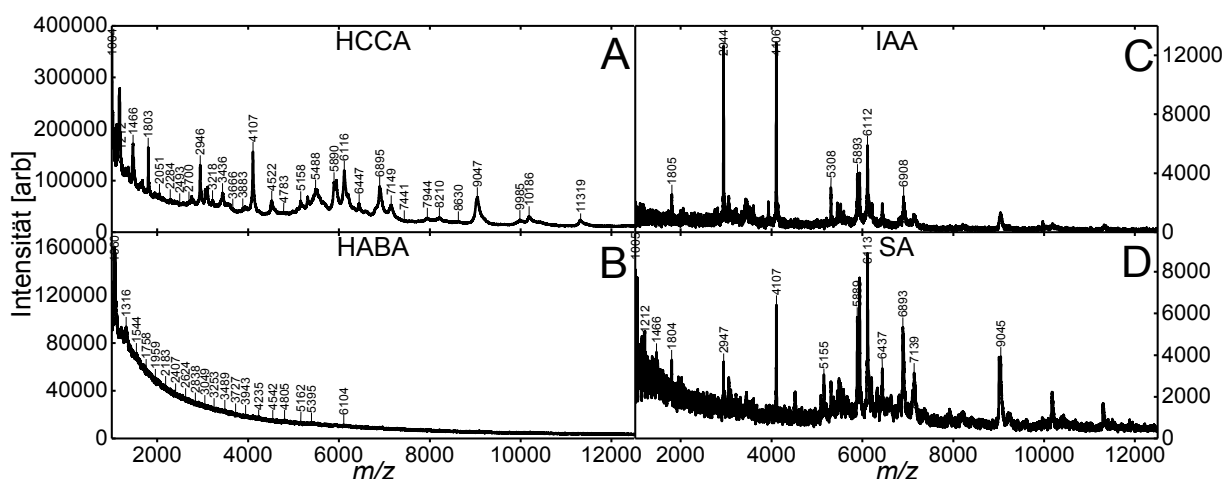


Abbildung 5-12: Vier ausgewählte Spektren der *C. avellana*-Pollenprobe zur Untersuchung der in Tabelle 5-2 aufgelisteten, eingerahmten Peak-Anzahl-Werte, gemessen mit folgenden Matrixsubstanzen: (A) HCCA, (B) HABA, (C) IAA und (D) SA (D) jeweils in H<sub>2</sub>O:ACN (TFA).

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass eine gute Löslichkeit nicht automatisch zu reproduzierbaren Spektren führt. Hier spielen weitere Faktoren, wie Polarität, Konzentration, Stoffklasse oder Massenbereich eine Rolle. Sie zeigen auch, dass die Ermittlung der geeigneten Matrix-Lösungsmittel-Kombinationen eine große Bedeutung für die späteren Peaks respektive Peakmuster-Erkennung hat. Die Detektion einer möglichst großen Anzahl von Peaks trägt zu einer höheren Variabilität der Spektren und damit besseren Unterscheidbarkeit bei.

### 5.1.2.2 Variation der Säuren zur Analytextraktion

Neben der Wahl für die Matrix, stellte in der vorliegenden Arbeit die Extraktion der Analyten aus den Pollenkörnern einen weiteren wichtigen Parameter dar. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert, gibt es hydrophobe Analyte wie Proteine oder Peptide, die sich mit einer wässrigen Matrixlösung nicht extrahieren lassen. In solchen Fällen empfiehlt sich die Vorbehandlung der Proben mit einer organischen Säure. In der Literatur wird vermutet, dass sich bereits dabei  $[M+H]^+$  Analytionen bilden, die beim Trocknen des Lösemittels in die Matrixkristallstruktur inkludiert werden und zu einer effektiveren Desorption in die Gasphase beitragen. Dabei zeigen abnehmende pH-Werte eine höhere Ionenausbeute. [310, 311]

Da Ameisensäure häufig zur Probenpräparation in BioTyping Experimenten verwendet wird [310, 311], wurden neben der 98 % Ameisensäure (pH~3) vier weitere Säuren untersucht. Dabei handelte es sich um Zitronensäure mit pH~3,5 bei 10 mg ml<sup>-1</sup>, Bernsteinsäure mit pH~4 bei 10 mg ml<sup>-1</sup> und Oxalsäure mit pH~2,5 bei 10 mg ml<sup>-1</sup>. Im Folgenden wurden diese vier Säuren sowie vier Kombinationen bestehend aus jeweils zwei

Säuren auf je einen Probenspot mit ähnlicher Menge von Pollenkörner aufgetragen. Nach dem Eintrocknen der Säurelösungen wurden jeweils 0,3 µl der wässrigen Matrixlösung (HCCA in 50 % ACN/0,1 % TFA) aufgetragen und nach erneuter Trocknung wurde ein Spektrum aufgenommen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wiederum in einem Balkendiagramm (Abb. 5-13), in dem der TIC der gemessenen Spektren, in jeweils drei Massenbereiche unterteilt, gezeigt wird. Die höchsten TIC-Werte wurden bei Verwendung von Ameisensäure (AS), Oxalsäure (OS) bzw. überraschenderweise insbesondere ohne Säure (Balken 1) erzeugt. Bei Verwendung von Zitronensäure (ZS) ergibt sich dagegen ein sehr niedriger TIC. Die Auftragung von 2 gemischten Säuren (Balken 6-9) resultierte ebenfalls in niedrigere TICs. Mit Blick auf die drei Massenbereiche fällt ins Auge, dass der höhere Massenbereich (5000-15000) bei Verwendung von Ameisensäure (Balken 3, gelber Bereich) mehr Peaks/Intensität aufweist. Im Gegensatz dazu ist der niedrige Massenbereich bis 3500  $m/z$  vor allem ohne Säureextraktion (Balken 1, blauer Bereich) etwas intensiver.

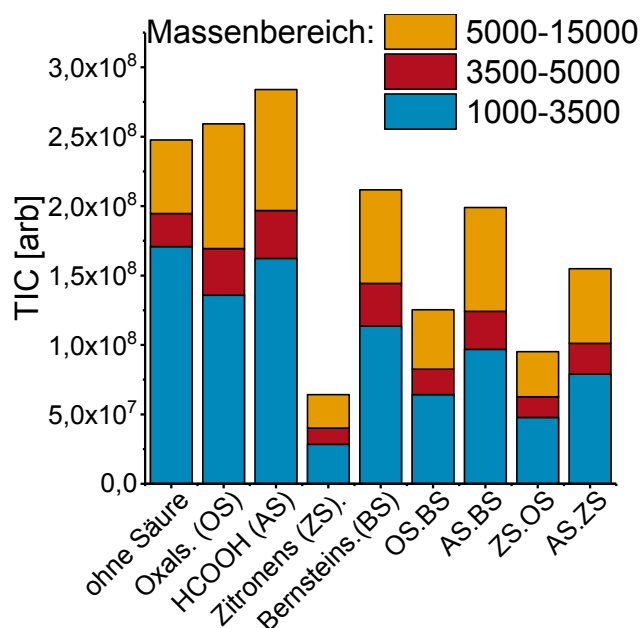


Abbildung 5-13: In drei Massenbereiche, d.h. 1000-3500, 3500-5000 und 5000-15000, unterteilter TIC-Wert von *C. avellana*-Pollenspektren, aufgenommen nach zusätzlicher Säurebehandlung während der Probenpräparation (500 Laserpulse, *random walk*, Laserfokus large, Laserintensität 75 %).

Die Ursache für die schlechtere Performance der drei zusätzlich untersuchten Säuren, Zitronen-, Bernstein- und Oxalsäure, könnte möglicherweise deren zu starke Verdünnung von ~ 0,1 M gewesen sein. Bei einer Erhöhung ihrer Konzentration und weiterer Reduzierung des pH-Wertes besteht jedoch die Gefahr, extrahierte Proteine zu hydrolysieren.

Neben der Säureextraktion gibt es weitere Möglichkeiten, die zur Erzielung höherer Peak-Intensitäten führen können. Schwartz *et al.* beschreiben zum Beispiel, dass eine Ethanol-Wäsche von Gewebeschnitten vor der Matrixauftragung vorteilhaft war. [312] Weitere Literaturstellen empfehlen den Einsatz anderer Probenträger zur Signalverbesserung, worauf im Folgenden detaillierter eingegangen wird. [81, 138, 139, 141, 142]

### 5.1.2.3 Variation der Probenträger

Neben dem Extraktionsschritt ist die Fixierung der Probe ein entscheidender Punkt für den Erfolg einer Messung. Wie im Abschnitt 2.2.2 zur Probenpräparation beschrieben, gibt es eine Reihe von Probenträgern, die in üblichen Massenspektrometern verwendet werden können. Dazu zählen der Standardprobenträger aus Edelstahl im Format einer Mikrotiterplatte (MTP 384), Träger mit hydrophober Beschichtung (AnchorChip), mit bereits vorhandenen HCCA-Matrixspots (pre-spotted AnchorChip), der metall-beschichtete Glasobjektträger (engl. *indium tin oxide*, ITO) und weitere Modifikationen. Eine besondere Rolle für die Untersuchungen spielten die Präparationen auf der Basis eines doppelseitig leitfähigen Carbonklebbands (engl. *conductive tape*, CT), das auf einem konventionellen MTP-Träger oder auf einem ITO-Objektträger aufgebracht war.

In Abbildung 5-14 sind MALDI-TOF MS-Spektren einer Probe (*C. avellana*) bei jeweils gleicher Probenvorbereitung (Überschichten mit 1 µl HCOOH, Trocknen, Zugabe von 1 µl HCCA-Matrix 10 mg ml<sup>-1</sup>) und identischen Geräteparametern (Lasereinstellung *random walk*, Laserfokus large, Laserintensität 75 %, 500 Laserpulse) auf 6 verschiedenen Probenträgern (engl. *targets*) abgebildet. Bei Betrachtung der Spektren in Abb. 5-14 fällt sofort auf, dass die oberen drei Spektren und insbesondere die bei Verwendung des ITO Trägers deutlich intensivere Peaks und detailliertere Peakmuster z.B. in der Region von *m/z* 5155-7141 aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen die unteren drei Spektren, abgesehen vom intensiven Peak bei *m/z* 4103, weniger gut aufgelöste Peaks.

Der vermeintliche Vorteil der Aufkonzentration der Extrakte auf einem der Anker des AnchorChip-Trägers führt hier im niederen Massenbereich zu einer hohen Intensität der Basislinie. Da das Anchor-Prinzip auf der Tropfenauftragung beruht, wird es, beim Vorhandensein von verschiedenen Pollenkörnern auf diesem Spot, unweigerlich zu einer Vermischung von deren Extrakten kommen. Dies schließt dessen Verwendung als Probenträger aus. Obwohl die auf ITO-Objektträgern gemessenen Spektren eine gute Qualität hinsichtlich Empfindlichkeit und Peak-Auflösung zeigten, wurde deren Verwendung im Folgenden ausgeschlossen. Gründe dafür sind das schlechtere Handling aufgrund des fehlenden Rasters und die kleinere Trägergröße, die nicht optimal für eine spätere Routineanwendung im Screening von Pollen wären.

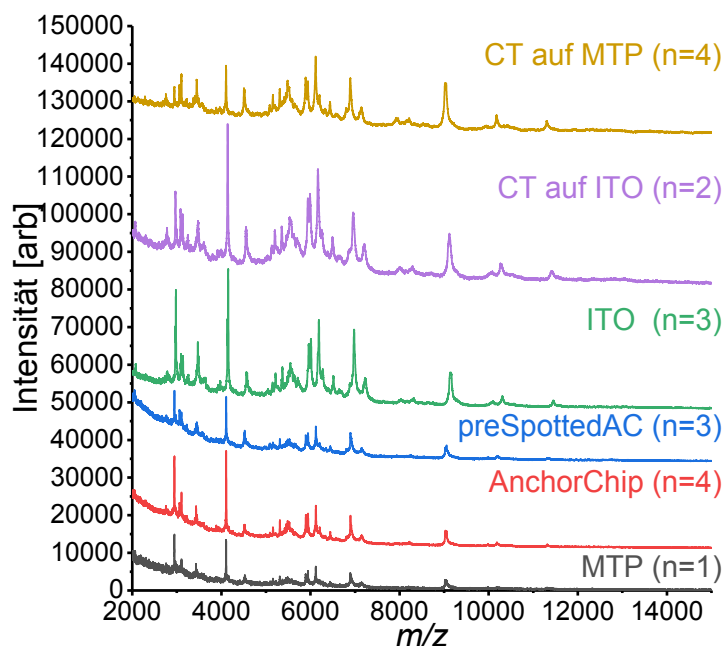


Abbildung 5-14: *C. avellana*-Pollenspektren (gemittelt aus Anzahl  $n$ ) auf 6 verschiedenen Targets bei gleicher Probenvorbereitung (Überschichten mit  $1\mu\text{L HCOOH}$ , Trocknen, Zugabe von  $1\mu\text{L HCCA}$ -Matrix  $10\text{mg ml}^{-1}$ ) und identischen Geräteparametern (Lasereinstellung *random walk*, Laserfokus large, Laserintensität 75 %, 500 Laserpulse).

Für die weiteren Untersuchungen wurde daher nur die CT-auf-MTP-Probenpräparation verwendet. Diese zeichnet sich durch ihre Robustheit und die Verwendung des Standardprobenträgers aus. Allerdings kann die Verwendung von Klebebändern in einem Hochvakuum-Massenspektrometer ( $10^{-7}$  mbar) durch Sublimation des Klebstoffes das Vakuum verschlechtern, weshalb nur notwendige Bereich des Standardprobenträgers mit CT bedeckt werden sollten. Die Verwendung des CT bietet jedoch die Möglichkeit, durch die unmittelbare Fixierung der Pollenkörner diese orts aufgelöst messen zu können. Dabei lässt sich auch ausschließen, dass mehrere Pollenkörner übereinander liegen, was die Detektion eines oder beider Pollenkörner durch die Vermischung beider Extrakte erschweren würde. Kajiwara *et al.* beschreiben bei der Anwendung von CT das Fehlen einiger Peaks im unteren Massenbereich sowie eine leichte Massenverschiebung, die möglicherweise durch die Höhe des Klebebandes und der damit verbundenen veränderten Geometrie der Ionenquelle des Massenspektrometers zusammenhängt. [81] Um dies zu verifizieren, wurde ein zusätzlicher Test an einem anderen MALDI-Massenspektrometer (rapifleX®, Bruker Daltonik) durchgeführt, das über einen höhenverstellbaren Probenstisch verfügt. Die in Abbildung 5-15 dargestellten Ergebnisse belegen, dass eine Variation von  $\pm 25\text{ }\mu\text{m}$  (entspricht der Größe eines *C. avellana*-Pollenkorns) lediglich zu einer Abweichung der Masse von Somatostatin  $m/z\ 3147,47$  um  $\pm 0,2\text{ Da}$  führte und für die Spektrenauswertung nicht berücksichtigt werden muss.

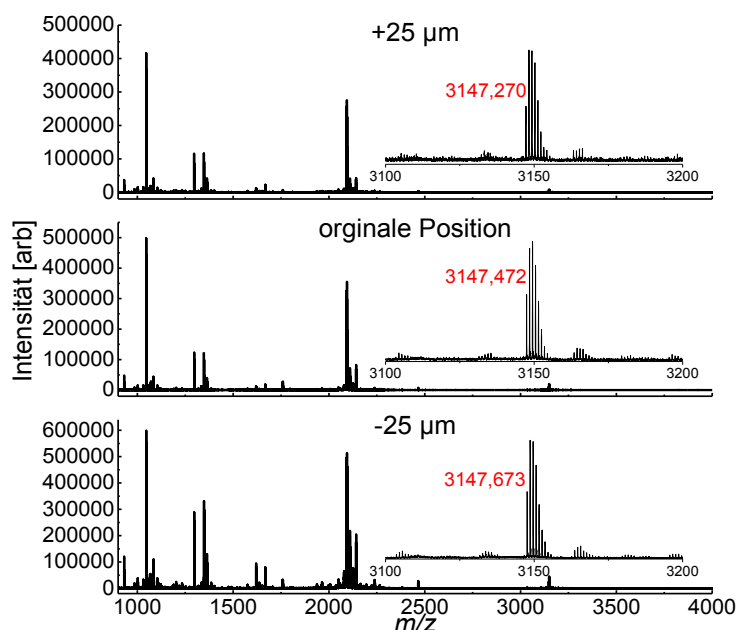


Abbildung 5-15: Drei Massenspektren einer Peptidmischung, gemessen mit einem rapifleX®-Instrument, das mit einem höhenverstellbaren Probenstisch ausgestattet ist. Eine Variation von 25 µm ergab eine Massenverschiebung von 0,2 Da für Somatostatin  $m/z$  3147,47.

#### 5.1.2.4 Optimierung der Probenpräparation

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, kann jeder einzelne Schritt der Probenvorbereitung entscheidend für den Erfolg einer Messung sein. Dies wurde bislang jedoch nur an einer Probe gezeigt. Dementsprechend stellt sich jetzt die Frage, welchen Einfluss diese Parameter auf die Klassifikation mehrerer unterschiedlicher Pollenproben hat. Dazu erfolgte im folgenden Experiment die systematische Variation des Extraktionsverfahrens, der Probenträger und der Matrixlösung. Insgesamt wurden 6 verschiedene Probenvorbereitungsverfahren auf zwei verschiedenen Probenträgern (MTP vs. CT-auf-MTP) für vier verschiedene Pollenproben untersucht:

ohne Extraktion ⇔ Tropfenextraktion ⇔ Gasphasenextraktion (3min)  
 ohne Zusatz von TFA zur Matrixlösung ⇔ Zusatz von TFA zur Matrixlösung

Diese Variation der Bedingungen wurde auf Pollenkörner der Gemeinen Hasel (*Corylus avellana*), der Herzblättrigen Erle (*Alnus cordata*), der Waldkiefer (*Pinus sylvestris*) und der Japanischen Moorbirke (*Betula tatewakiana*) angewendet. Dabei gehört die *P. sylvestris*-Probe zur Familie der *Pinaceae* aus der Ordnung der *Coniferales*, während die anderen drei Proben aus der Familie der *Betulaceae* der Ordnung *Fagales* entstammen.



Die gezeigten Mittelwerts-Spektren (Abbildung 5-16), generiert aus jeweils fünf Wiederholungen, wurden im *random walk*-Modus (4x500 Laserpulse, Laserfokus *ultra*, Laserintensität 55 %) aufgenommen. Die Intensitäten der Spektren einer Probe (Abb. 5-16-I und -II, 1 a-I, 2 a-I, 3 a-I, 4 a-I) sind jeweils gleich skaliert. Zum Vergleich der Intensitäten unterschiedlicher Pollenproben wurde in den jeweiligen Abbildungen a ein Maßstab von 5000 [arb] eingefügt.

Die Mittelwerts-Spektren einer jeweiligen Spezies (Abb. 5-16-I und -II, 1 a-I, 2 a-I, 3 a-I, 4 a-I) zeigen vergleichbare, offenbar spezifische Peakmuster. Bei genauerer Analyse werden leichte Verschiebungen der Massen und Unterschiede in den Signalintensitäten in Abhängigkeit von den verschiedenen Methoden sichtbar. An Hand der Mittelwerts-Spektren der *A. cordata*-Probe (Abb. 5-16-I, 2 a-I) soll auf diese Unterschiede im Folgenden eingegangen werden. Spektren, die von dieser Probe auf dem leitfähigen Klebeband aufgezeichnet wurden (Abb. 5-16-I, 2 a-f), zeigen im Allgemeinen höhere Intensitäten als die, die bei gleichen Bedingungen auf dem Edelstahlprobenträger (Abb. 5-16-I, 2 g-I) gemessen wurden. Insbesondere die Zugabe von TFA zur Matrixlösung (Abb. 5-16-I, 2 a-c, g-i) führte im Vergleich zu den entsprechenden Spektren ohne TFA-Zugabe zu erhöhten Signalintensitäten (Abb. 5-16-I, 2 d-f, j-I).

In den Spektren, die nach HCOOH-Gasphasenextraktion der Probe erhalten wurden, sind sowohl der Untergrund im unteren Massenbereich als auch die absoluten Signale intensiver als in den Spektren, die nach Säuretropfenextraktion erhalten wurden.

Überraschenderweise weisen Spektren von Pollenproben, die kein zusätzliches Extraktionsverfahren durchliefen, im niederen Massenbereich Signalintensitäten auf, die denen der Spektren nach Gasphasenextraktion entsprechen während Peaks im höheren Massenbereich wie z.B.  $m/z$  6891 und  $m/z$  9489 sogar noch intensiver sind (Abb. 5-16-I, 2 a, d, g, j). So konnte das intensivste Spektrum von *A. cordata* mit allen charakteristischen Massen auf leitfähigem Klebeband unter Verwendung eines Matrixlösungsmittels aus ACN/H<sub>2</sub>O mit TFA-Zusatz erhalten werden, ohne dass zusätzliche Extraktionsschritte erforderlich waren (Abb. 5-16-I, 2 a).

Dieses überraschende Ergebnis konnte, mit Ausnahme der Birkenprobe (*B. tatewakiana* Abb. 5-16-II, 4), die bei den meisten der untersuchten Bedingungen ohnehin gute Spektren ergaben, im Verlaufe der Untersuchung der anderen Pollenproben (Abb. 5-16-I, 1 a und 5-16-II, 3 a) bestätigt werden. Insbesondere in diesen Experimenten genügte die Zugabe der mit Säure versetzten Matrixlösung zur Extraktion der charakteristischen Analyten aus den Exinen.

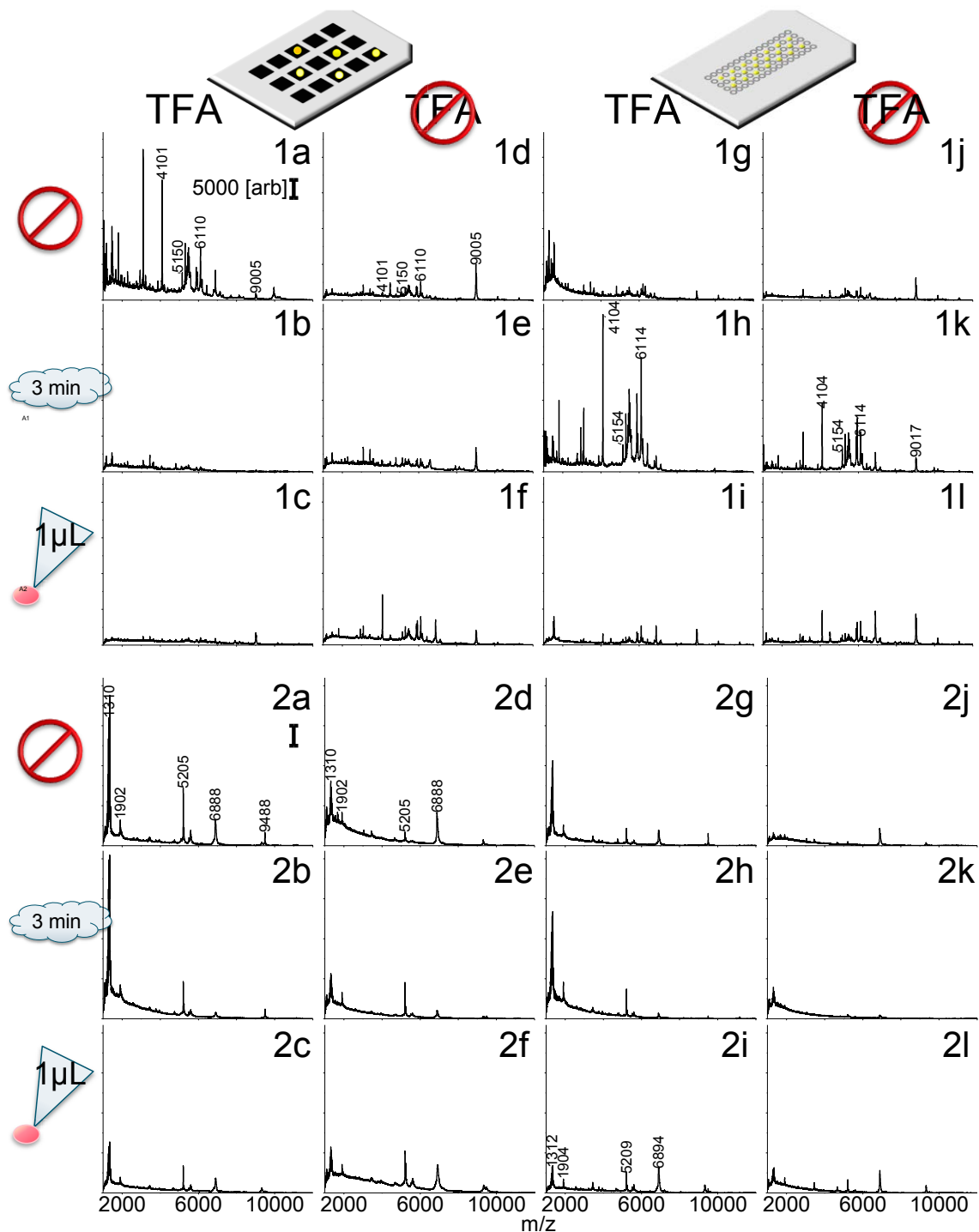


Abbildung 5-16-I: Mittelwerts-(n = 5)-Massenspektren von (1) *Corylus avellana*- und (2) *Alnus cordata*-Pollenproben. Senkrechte Spalten repräsentieren die verwendeten Proben-träger: (a-c) Edelstahltarget mit leitfähigem Klebeband und Matrixlösung mit und (d-f) ohne TFA, (g-i) Edelstahltarget ohne leitfähiges Klebeband mit und (j-l) ohne TFA in der Matrixlösung; Waagrecht: Variation der Extraktionsverfahren: jeweils (oben) ohne zusätzliche Säureextraktion, (mittig) 3 min HCOOH-Gasphasenextraktion und (unten) HCOOH-Tropfenextraktion.

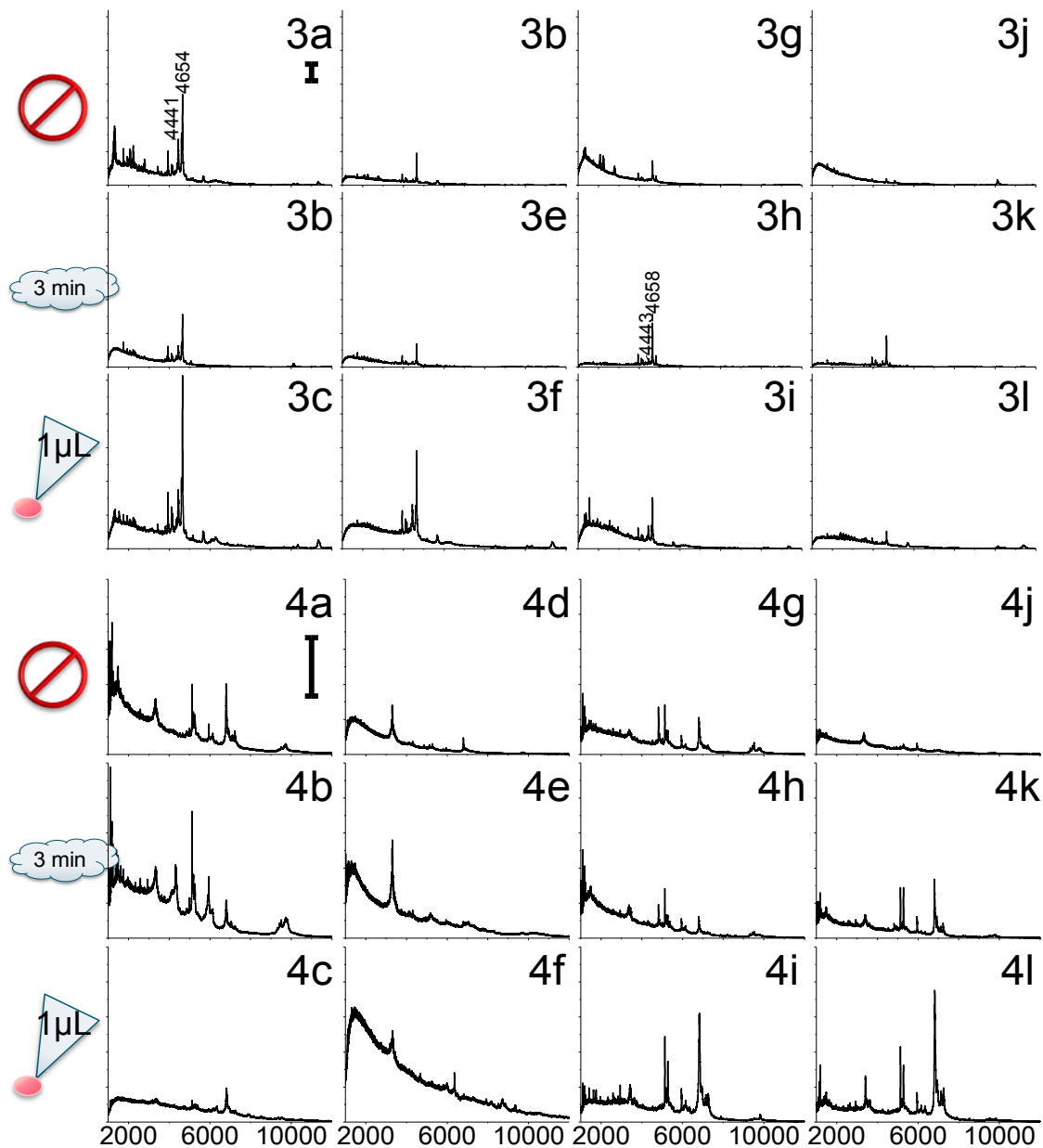


Abbildung 5-16-II: Mittelwerts-(n = 5)-Massenspektren von (3) *Pinus sylvestris*- und (4) *Betula tatewakiana*-Pollenproben. Senkrechte Spalten repräsentieren die verwendeten Probenträger: (a-c) Edeltarget mit leitfähigem Klebeband und Matrixlösung mit und (d-f) ohne TFA, (g-i) Edeltarget ohne leitfähiges Klebeband mit und (j-l) ohne TFA in der Matrixlösung; Waagerecht: Variation der Extraktionsverfahren: jeweils (oben) ohne zusätzliche Säureextraktion, (mittig) 3 min HCOOH-Gasphasenextraktion und (unten) HCOOH-Tropfenextraktion.

Wie bereits erwähnt zeigen die Spektren aller vier Pollenproben spezifische Peakmuster, die eine erste Differenzierung der Spezies durch einen visuellen Vergleich der Spektren erlauben. Weit besser jedoch, weil objektiv, kann durch Methoden der multivariaten Datenanalyse eine Differenzierung erreicht und eine Bewertung der verwendeten Probenbehandlungsmethoden ermöglicht werden.

Multivariate Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) werden bereits zur Auswertung von MS Daten verwendet. [274, 280, 282, 283] Mit ihnen ist es möglich, die Komplexität von Daten zu reduzieren oder Unterschiede zwischen bzw. in Datensätzen hervorzuheben. In der hier gezeigten Untersuchung zur Probenpräparation wurde die PCA zur Klassifizierung der vier Pollenproben verwendet. So sollte eine speziesübergreifende Auswahl der optimalen Präparationsmethoden erfolgen. Hauptkomponenten (PC) sind lineare Kombinationen der ursprünglichen Massenspektren und mit den PC lässt ein neues varianzgewichtetes Koordinatensystem erzeugen. Die PCA ist durch zwei Matrizen gekennzeichnet - den Faktorenladungen (engl. *loadings*) und den Faktorenwerten (engl. *scores*) -, zusätzlich wird der Prozentsatz der repräsentierten Varianz des Faktors angegeben.

Abbildung 5-17 veranschaulicht das Prinzip einer PCA. Aus der Ausgangsmatrix, hier von 20 bereits interpolierten, basislinienkorrigierten und vektornormalisierten Spektren (siehe dazu Kapitel 4.6 im Methodenteil), werden in der PCA Scores und Loadings berechnet. Die Scores mehrerer PCs lassen sich dann gegeneinanderstellen (Abb. 5-17 B) und deren Loadings (Abb. 5-17 C) entsprechend abbilden.

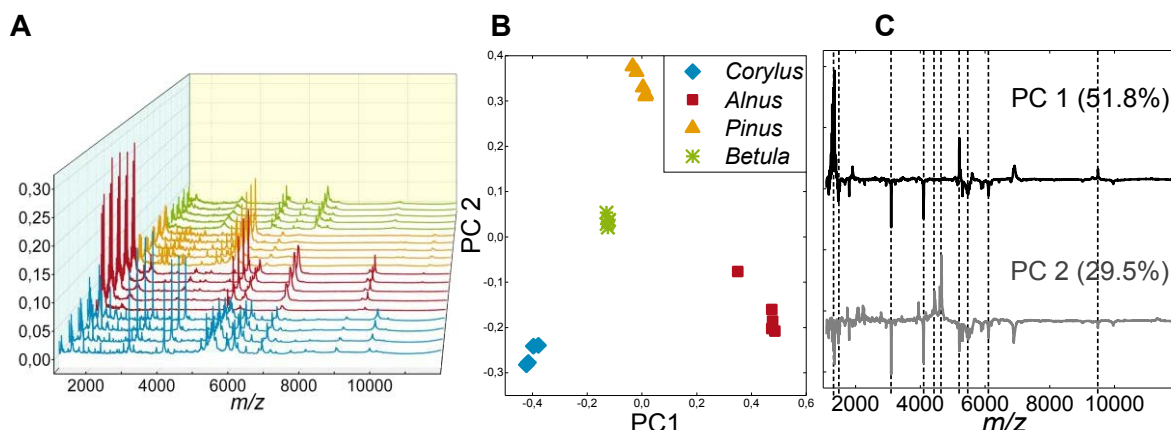


Abbildung 5-17: Prinzipieller Ablauf einer PCA, hier gezeigt mit PC 1 und 2: Aus der Ausgangsmatrix, repräsentiert durch (A) 20 Massenspektren, werden (B) Score-Werte und (C) Loadings ermittelt. Die Datenvorbehandlung der Spektren (A) wird in den Methoden Kapitel 4.6 erläutert.

Diese Art der Hauptkomponentenauswertung wurde für jede unterschiedliche Präparation der vier Pollenproben (Abb. 5-16-I und II) durchgeführt. Die Scores der ersten und zweiten PC jeder dieser 12 Varianten sind in Abbildung 5-18 gezeigt. Um die Differenzierung der Pollenproben zu beurteilen, wurden die Scores der einzelnen PC hinsichtlich der Intra- und Inter-Spezies-Abstände begutachtet. Zusätzlich zeigt Abbildung 5-19 die dazu entsprechenden Loadings, über die eine Verbindung zwischen den Hauptkomponenten und

den Originaldaten hergestellt werden kann. Dieser Zusammenhang hilft bei der Interpretation der in Abbildung 5-18 gezeigten Scores, denn die Loadings geben an, welche Teile des Spektrums für die jeweilige PC relevant sind und zur Unterscheidung der Pollendaten in den Scores-Plots von Abbildung 5-18 führen.

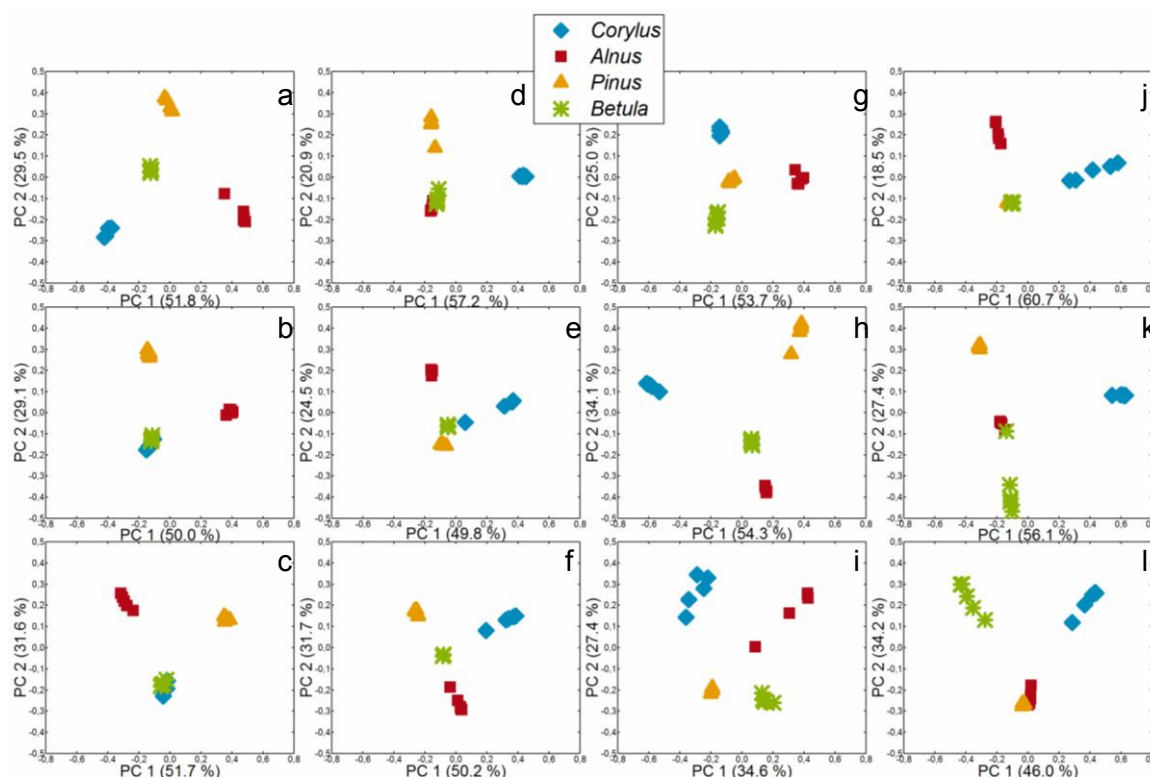


Abbildung 5-18: 12 PCAs mit Scores und Varianzen der PC 1 und 2 aus je 20 Spektren der *C. avellana*- (blau), *A. cordata*- (rot), *P. sylvestris*- (gelb) und *B. tatewakiana*- (grün)-Pollenproben bei unterschiedlicher Präparation (analog zu Abb. 5-16).

D.h. senkrechte Spalten: Variation des Targets und der Matrixlösung, genauer (a-c) CT mit TFA, (d-f) CT ohne TFA, (g-i) Edelstahlträger mit TFA und (j-l) ohne TFA; waagerecht die Extraktionsverfahren, genauer oben (a, d, g, j) ohne zusätzliche Extraktion; mittig (b, e, h, k) Gasphasenextraktion und unten (c, f, i, l) mit Tropfenextraktion.

Bei Betrachtung der Scores-Plots fällt zunächst eine Variante der Präparation, genauer die Variation der TFA Zugabe zu den Matrixlösungen auf. Die PCA von Spektren, bei deren Aufnahme kein TFA in der Matrixlösung enthalten war (Abb. 5-18, Spalten 2 und 4), zeigen alle ein charakteristisches Merkmal. In diesen Scores-Plots weisen die *C. avellana*-Spektren (blaue Diamanten) alle positive Scores-Werte für die PC 1 auf, während die Scores der Spektren der drei anderen Spezies im negativen Bereich oder nahe Null liegen. In den entsprechenden Loadings sind daher in der PC 1 (Abb. 5-19, Spalten 2 und 4, schwarze Graphen) jeweils der entsprechende *C. avellana*-typische Spektralbereich von  $m/z$  5150 bis 6110 oder die Peaks bei  $m/z$  4101 und 9005 im positiven Bereich zu finden.

Die Unterscheidung der anderen drei Spezies ist in keiner dieser PCAs (Abb. 5-18/ 5-19, Spalten 2 und 4) eindeutig möglich. Eine bessere Differenzierung war auch nicht über die Scores anderer Hauptkomponenten (PC 3, PC 4) möglich. Die Hauptvarianz in diesen Datensätzen wird über die *C. avellana*-Probe abgebildet, da diese Spektren nur ein geringeres Rauschen und einen niedrigeren Hintergrund enthalten. Die Spektren der anderen Spezies liefern hingegen geringere Qualitäten, wodurch die einseitigen Inter-Spezies-Varianzen in den PCAs entstehen.

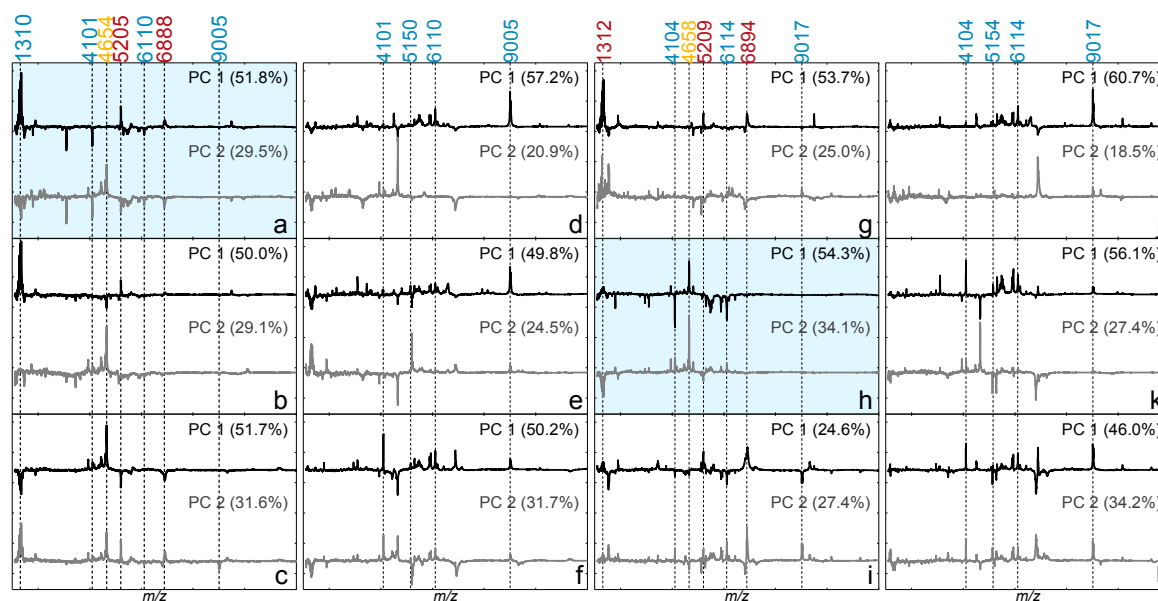


Abbildung 5-19: Loadings und Varianzen in Klammern der PC 1 in schwarz und PC 2 in grau der in Abb. 5-18 gezeigten PCAs.

In den PCAs der Spektren, die nach Zugabe von TFA zur Matrixlösung erhalten wurden, konnte eine artspezifische Klassifikation (Inter-Spezies-Varianz) aller 4 Pollenproben unter Verwendung der ersten beiden PCs in der Mehrzahl der Präparationen erhalten werden (Abb. 5-18 a, g, h, i). Bei näherer Betrachtung dieser vier Scores-Plots zeigte Plot i (Abb. 5-18) eine inhomogene Verteilung (Intra-Spezies-Varianz) der Spektren von *A. cordata* (rote Rechtecke) und *C. avellana* (blaue Diamanten). Ähnliche Intra-Spezies-Varianzen findet sich in der unteren Zeile in den Abb. 5-18 (f, i, l), deren Spektren nach Tropfenextraktion mit Ameisensäure generiert wurden. Deren nicht reproduzierbare Verdampfung führte möglicherweise zur Ausbildung inhomogener Spots und damit variierenden Peak-Intensitäten.

Im Gegensatz dazu weisen die PCAs von Spektren, die ohne Extraktion oder nach Gasphasenextraktion aufgenommen wurden (Abb. 5-18 a, b, g, h), eine bessere Homogenität innerhalb der Spezies auf. Eine eindeutige Tendenz bezüglich der Inter-

Spezies-Varianz ist jedoch nicht erkennbar. Lediglich im Scores-Plot b sind sich die Scores-Werte (bei PC 1 und PC 2) aus den *C. avellana*- und *B. tatewakiana*-Spektren ähnlich.

Da die Scores-Plots a, h die beste Separation aller Pollenproben zeigten, sollen die zugrundeliegenden PCAs hier im Detail diskutiert werden. In Abb. 5-18 a zeigen die *C. avellana*-Spektren (blaue Diamanten) negative Scores für PC 1 und PC 2, die zu negativen *C. avellana*-typischen Peaks (verglichen mit Abb. 5-16-I, 1 a-l/ Abb. 5-10) in den jeweiligen Loadings passen (z.B. sichtbar in Abb. 5-19 a mit  $m/z$  bei 4101,  $m/z$  9005 und der Bereich von  $m/z$  5150 bis 6110 schwarzes PC1-Spektrum und graues PC2-Spektrum). *A. cordata*-Spektren dagegen liefern Scores (Abb. 5-18 a, rote Rechtecke), die für die PC 1 positiv und für die PC 2 negativ sind. Die entsprechenden Loadings (Abb. 5-19 a) enthalten in diesen Bereichen somit Peaks von  $m/z$  1310 bis 1902, um  $m/z$  5205 und  $m/z$  6888, die den *A. cordata*-Referenzspektren (verglichen mit Abb. 5-16-I, 2 a-l) zugeordnet werden können. Die *P. sylvestris*-Spektren ergaben Scores nahe Null für die PC 1 (Abb. 5-18 a, gelbe Dreiecke) und positive Scores für die PC 2. Folglich wies der Loading-Vektor der PC 1 in Abb. 5-19 a die Peakgruppe bei  $m/z$  4654 im positiven Bereich auf. Diese *P. sylvestris*-typischen Peaks (verglichen mit Abb. 5-16-II, 3 a-l) sind im Loading der PC 1 nicht zu erkennen. Die Scores (Abb. 5-18 a, grüne Sterne) der *B. tatewakiana*-Spektren liegen alle um den Nullpunkt des Koordinatensystems, daher zeigten die Loadings (Abb. 5-19 a) keine klaren Peaks, die den *B. tatewakiana*-Spektren zugeordnet werden können.

In Scores-Plot h aus Abb. 5-18 liefern die *C. avellana*-Spektren (blaue Diamanten) negative Scores für die PC 1 und positive Werte für die PC 2. Die jeweiligen Loadings (Abb. 5-19 h) enthalten daher negative und positive *C. avellana*-typische Peaks im schwarzen (PC 1) bzw. grauen (PC 2) Loading-Vektor (z.B. bei  $m/z$  4104 und dem Massenbereich von  $m/z$  5154 bis 6114). Darüber hinaus ergaben die *A. cordata*-Spektren für die PC 1 Scores (Abb. 5-18 h, rote Rechtecke) um Null und für die PC 2 negative Scores. Im Loading der PC 2 (Abb. 5-19 h) wurden entsprechend negative Werte für das *A. cordata*-typische Peakmuster im unteren Massenbereich ( $m/z$  1312 bis 1904) gefunden. Aus den *P. sylvestris*-Spektren ermittelten sich jeweils positive Scores für die PC 1 und PC 2 (Abb. 5-18 h, gelbe Dreiecke), und die *P. sylvestris*-typische Peakgruppe bei  $m/z$  4658 konnte in den entsprechenden Loadings (Abb. 5-19 h) gefunden werden. *B. tatewakiana*-Spektren sind in dieser PCA wiederum durch Scores um Null (Abb. 5-18 h, grüne Sterne) charakteristisch, die zu Loadings führten, die keine *B. tatewakiana*-typischen Eigenschaften aufwiesen.

Diese Ergebnisse der hier gezeigten Untersuchung verdeutlichen erneut, dass die höchsten absoluten Signalintensitäten in den Spektren aufgezeichnet werden konnten, die von den Proben herrührten, die auf leitfähigem Klebeband fixiert waren. Dies lässt sich leicht über

den direkten Vergleich der Spektren mit dem jeweiligen Pendant auf dem MTP-Träger erkennen (vergleiche Abb. 5-16-I und -II, a-f mit g-I).

Vermutlich ist die Verwendung des leitfähigen Klebebandes bei der Extraktion vorteilhaft, da es die aus den Pollenkörnern extrahierten Analyten näher am Pollenkorn hält, was zu höheren Analytkonzentrationen und dementsprechend höheren Signalintensitäten führt. Darüber hinaus veranschaulicht die gezeigte Optimierung, dass eine Säurebehandlung der Pollenkörner für eine ausreichende Extraktion von Analyten unabdingbar ist. Ohne diese Behandlung (siehe Abb. 5-16-I und -II, d, j), weisen die MALDI-Massenspektren weniger Peaks auf und die verschiedenen Pollenproben können in der PCA nicht eindeutig unterschieden werden (Abb. 5-18 d, j). Bei der notwendigen Säurebehandlung ist jedoch weniger die Art der Applikation entscheidend. So resultierte die Probenpräparation a in der besten Klassifikation der vier Pollenproben, welche keine explizite Zugabe von Ameisensäure aber geringer Mengen von TFA zur Matrixlösung erforderte (Abb. 5-18 a).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Präparationstechnik besonders geeignet ist. Diese beruht auf der Fixierung der Pollenkörner auf leitfähigem Klebeband, gefolgt von der Übersichtung mit gelöster Matrix, die geringe Mengen an Säure enthält. Dieser Ansatz garantiert, dass die Extrakte nahe an den Pollenkörnern bleiben und sich, selbst bei Anwesenheit eines zweiten Pollenkorns einer möglicherweise anderen Spezies, nicht komplett miteinander vermischen. Dies würde die Empfindlichkeit der MALDI-Messungen steigern und somit erstmals die Messung einzelner Pollenkörner ermöglichen.

### 5.1.3 Vereinfachte Auswertung mithilfe einer grafischen Benutzeroberfläche

Nach der zuvor erfolgten Optimierung der instrumentellen und experimentellen MALDI-Parameter, stellte sich die Frage nach einer vereinfachten Auswertung der Spektren. So enthielt z.B. der Datensatz zur Optimierung der Probenpräparation (Kapitel 5.1.2.4) 12 PCAs von je 20 Spektren von 4 Pollenproben. Im Folgenden wird gezeigt, wie sich die entwickelte, auf Matlab-basierende Auswertestrategie benutzerfreundlich gestalten und im besten Falle direkt auf dem zur Steuerung des MS verwendeten Computers anwenden lässt. Zu diesem Zweck wurde die Aufbereitung der MALDI-Spektren über verschiedene Funktionen verglichen und die optimierten Berechnungen in eine grafische Benutzeroberfläche (GUI) integriert. Über eine GUI laufen die Berechnungen von Matlab-Funktionen verborgen vor dem Anwender und resultieren schließlich in einer einfachen und schnellen Darstellung der Ergebnisse.



### 5.1.3.1 Modifikation bei Basislinienkorrektur und Normierung der Spektren

Zur Untersuchung des Einflusses sowohl der Basislinienkorrektur als auch der Normierung auf die Aufbereitung der Spektren wurde ein Datensatz (Kapitel 5.1.2.4, Abb. 5-16 c, gemessen auf CT, Tropfenextraktion mit HCOOH, Matrixlösung mit TFA) ausgewählt, der keine ausreichende Separation der Pollenkörner in der PCA aufwies. Wie in Abb. 5-16 c dargestellt, konnten in diesem Datensatz die *C. avellana* (blaue Diamanten) und *B. tatewakiana* (grüne Sterne) Proben nicht voneinander unterschieden werden.

Im Folgenden wurden die einzelnen Matlab-Rechenschritte vereinfacht und drei Basislinien-(BL)-Korrekturen: polynomiale Basislinienkorrektur, MSbackadj-Korrektur und asLS Basislinienkorrektur sowohl einzeln, als auch in Kombination mit Normierungsverfahren auf den Datensatz angewendet. Die drei ausgewählten Normierungen: maximale Intensität des Spektrums, Vektornormierung und Normierung bezogen auf die Fläche unter dem Spektrum/TIC wurden darüber hinaus auch einzeln für den interpolierten, nicht korrigierten Datensatz (yinter) verwendet. Zum besseren Vergleich aller Varianten wurde für die 20 entsprechend behandelten Spektren der vier Proben jeweils der Silhouetten-Koeffizient berechnet (Tabelle 5-3, Spalte 1-4). Bei dieser Berechnung erhält jedes Spektrum eine Silhouetten-Score von -1, d.h. das Spektrum ähnelt den Spektren einer anderen Spezies, bis +1, d.h. das Spektrum ähnelt den anderen Spektren derselben Spezies. Der Silhouetten-Koeffizient ist dann der Mittelwert aller 20 Silhouetten-Scores.

Da darüber hinaus eine hohe Separation der PCA Score-Werte erzielt werden sollte, wurde die Silhouetten-Berechnung zusätzlich auf die Score-Werte (PC 1/PC 2) aus den PCAs dieser Spektren angewendet (Tabelle 5-3, Spalte 5-8).

Die Tabelle 5-3 zeigt sowohl bei separater BL-Korrektur (Spalte 1/5) als auch bei separater Normierung (Zeile 1) eine deutliche Verbesserung in der Differenzierung im Vergleich zum Ausgangsdatsatz (y(inter), ohne Normierung). Am besten (grün markiert) schneidet bei der Distanz der Spektren die polynomiale Basislinienkorrektur gefolgt von der Vektornormierung ab. Bezogen auf die Scores-Werte ist der Silhouetten-Koeffizient nach msbackadj-Korrektur, gefolgt von einer Normierung über die maximale Intensität des Spektrums am größten.

Tabelle 5-3: Berechnete Silhouetten-Koeffizienten für Normierungsverfahren (spaltenweise) und Basislinienkorrekturen (zeilenweise) zum einen basierend auf der Distanz der Spektren (Spalte 1-4) und zum anderen basierend auf der Distanz der Score-Werte von PC 1/PC2 (Spalte 5-8).

Silhouetten-Koeffizient: basierend auf:									
Distanz der Spektren					Distanz der Scores (PC 1/PC2)				
		Normierung							
		ohne	Max Peak	Vektor	TIC/ AUC	ohne	Max Peak	Vektor	TIC/ AUC
BL-Korrektur	y (inter)	0,081	0,483	0,623	0,605	-0,173	0,151	0,461	0,459
	y (pnBL)	0,346	0,490	0,739	0,729	0,215	0,416	0,646	0,416
	y (asLS)	0,442	0,624	0,736	0,717	0,345	0,764	0,534	0,546
	y (msbackadj)	0,433	0,627	0,733	0,627	0,327	0,819	0,626	0,526

Dementsprechend werden in der folgenden Abbildung 5-20 diese beiden Varianten (A-D: pn-BL+Vektor und E-H: MSbackadj+Max Peak) jeweils untereinander dargestellt und verglichen. Beim Blick auf die aufbereiteten Spektren (B/F) zeigt sich, dass die MSbackadj-Korrektur in einigen Fällen Signale mit starken Rauschen ausgibt (F, blau und grün), was durch die Normierung über die maximale Intensität noch überdeutlich verstärkt wird. Zudem weisen die *C. avellana*- und *B. tatewakiana*-Spektren, auf Grund ihres geringeren S/N-Verhältnisses, mit niedrigen Silhouetten-Scores eine große Ähnlichkeit auf (E). Andererseits führt diese Art der spektralen Aufbereitung der Spektren in der PCA zu einer klaren Separation aller vier Spezies (G). Im Gegensatz dazu sind die Spektren nach polynomialer Basislinienkorrektur und Vektornormierung optisch scheinbar besser auseinander zu halten (B), allerdings lassen sich wie bisher die Pflanzenspezies in diesen Spektren in der PCA nicht komplett voneinander unterscheiden. Dies liegt offensichtlich an der Dominanz einzelner *Pinus*-Signale, welche eine hohe Varianz abbilden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine spektrale Aufbereitung zur Verbesserung der Intra- und Inter-Spezies-Abstände beiträgt. Die Normierung auf die maximale Intensität kann jedoch bei Spektren mit geringem S/N-Verhältnis dazu führen, dass das Rauschen übermäßig verstärkt wird. Dies birgt die Gefahr, dass eine Varianz nicht mehr durch artspezifische Signale hervorgerufen wird, sondern letztlich nur das Rauschen abbildet. Darum kam in der im Folgenden dargestellten Entwicklung der grafischen Benutzeroberfläche lediglich eine vereinfachte Version der bisher verwendeten polynomialen Basislinienkorrektur und Vektornormierung zum Einsatz.

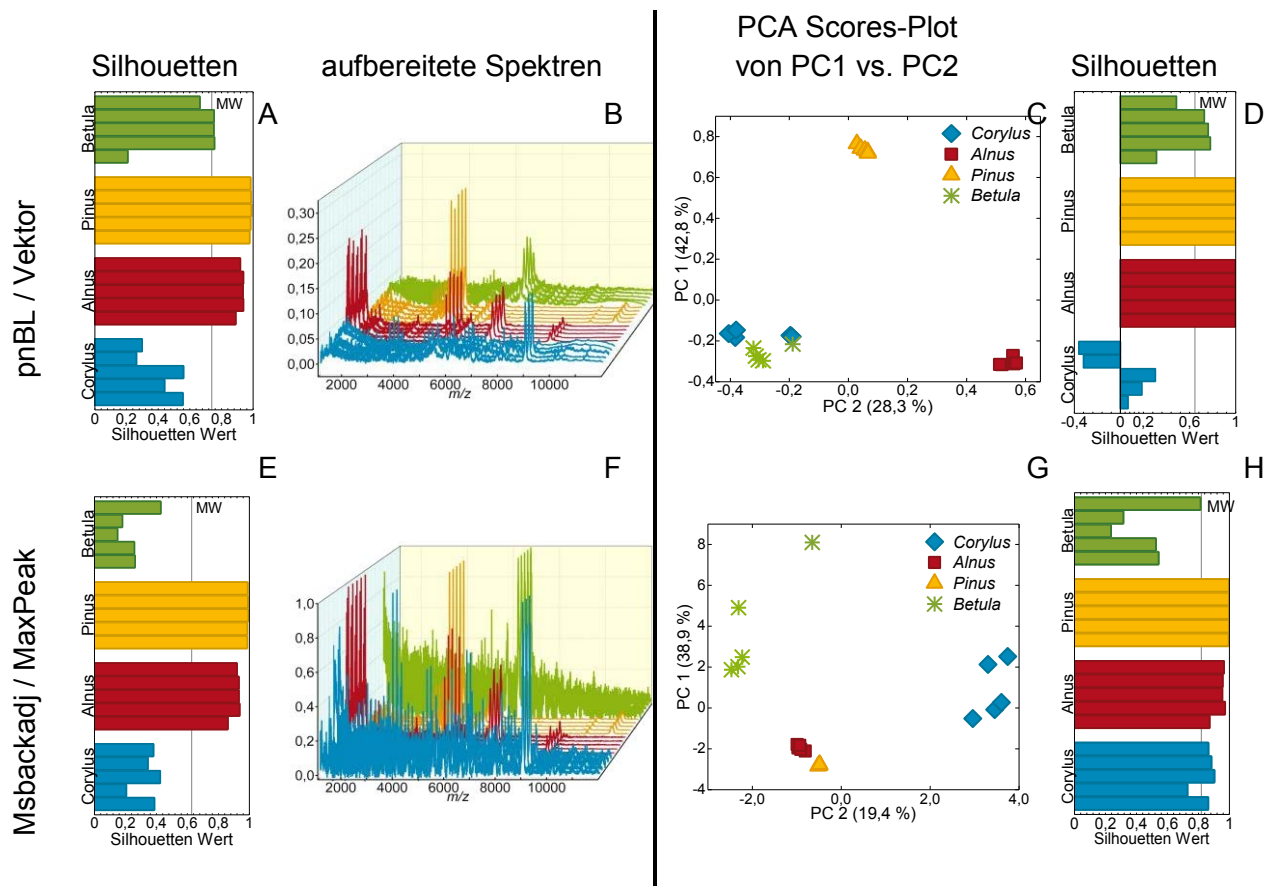


Abbildung 5-20: Abgebildet sind (B/F) 20 Spektren jeweils nach ausgewählter Basislinienkorrektur und Normierung gefolgt von (C/G) den PCA Scores-Plots dieser Spektren. Links und rechts davon sind die jeweils passenden Silhouetten angegeben und der Mittelwert (MW) aus Tab. 5-3 eingezeichnet.

### 5.1.3.2 Entwicklung einer grafischen Benutzeroberfläche

Zum Erstellen einer solchen grafischen Benutzeroberfläche (GUI) bietet Matlab eine Entwicklungsumgebung (GUIDE) an, in der Objekte, wie z.B. Schaltflächen, Schieberegler, Text-Boxen, Achsen oder Tabellen, beliebig anordnen und formatieren werden können. Da zusätzlich festgelegt werden muss, welche Aktionen bei der Bedienung dieser Objekte ausgelöst werden sollen, existieren programmierbare Callback-Events, wie z.B. Callback, ButtonDownFcn, CreateFcn, und andere. Die Programmierung dieser Funktionen mit den einzelnen Rechenschritten erfolgt dann in einer separaten Code-Sequenz. Diese, für den Anwender beim Benutzen der GUI nicht sichtbare Code-Sequenz ist das Herzstück der GUI. So lässt sich beispielsweise die in A (Abb. 5-21) eingefügte Schaltfläche über den gezeigten Inspektor mit Arial, Schriftgrad 16 und fett definieren und in B in der Code-Sequenz nach `function pushbutton1_Callback` hinterlegen, welche Berechnung beim Klick auf die Schaltfläche abläuft.

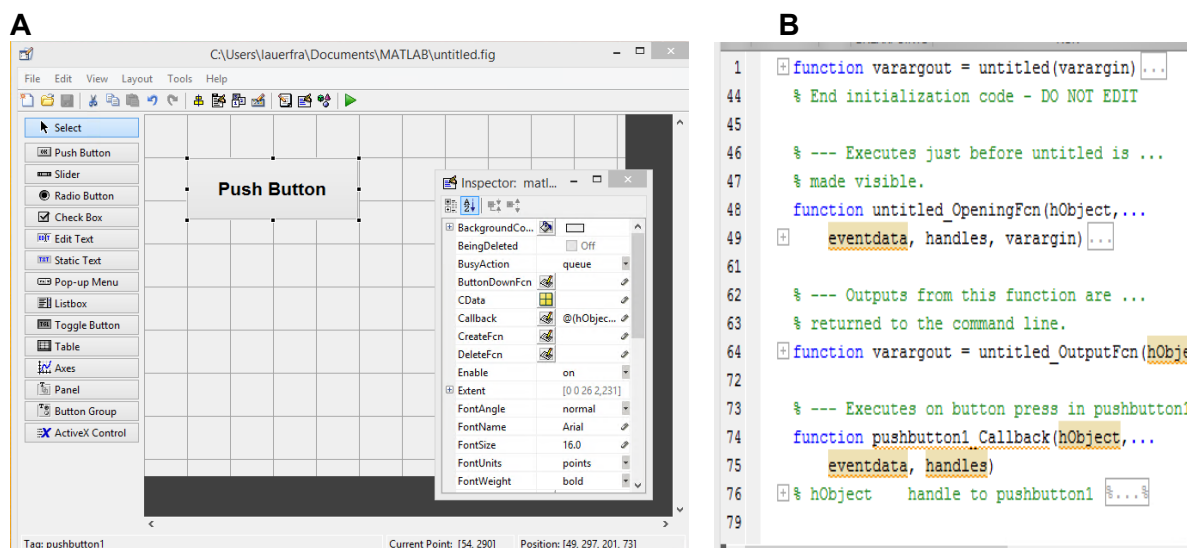


Abbildung 5-21: (A) zeigt die in Matlab gegebene Entwicklungsumgebung mit der Auswahl der Objekte, einer eingefügten Schaltfläche und dem Inspektor zum Ändern der Objekteigenschaften. (B) zeigt den von Matlab ausgegebenen Quellcode zu dieser untitled-GUI, mit der Callback-Funktion für die eingefügte Schaltfläche.

Da eine solche Programmierung eine interessante Möglichkeit bietet, Matlab-Berechnungen auf eine vereinfachte Art für Nutzer anwendbar zu machen, wurde für die Auswertung der MALDI-Spektren die in Abbildung 5-22 gezeigte GUI erstellt, dessen Fenster in zwei Bereiche unterteilt wurde: linksseitig die automatische Darstellung der Berechnungsergebnisse und rechtsseitig die optionalen Objekte zum Ausführen durch den Anwender. So zeigt die GUI auf der linken Seite den gewählten Plot (②) und darunter eine Tabelle (③), während verschiedene auswählbare Optionen zu Auswertungskernthemen (④-⑥) in den Panels rechts angeordnet wurden.

- A. Die Routine beginnt zunächst mit dem Upload der Daten (①). Beim Klick auf die Load-in-Schaltfläche lassen sich alle gewünschten Spektren mit \*.txt oder \*.dat Endung gleichzeitig auswählen und in die GUI importieren. Sobald der angewählte Dateipfad in der statischen Text-Box erscheint, bestätigt dies dem Anwender den erfolgreichen Upload der Dateien (Abb. 5-22 A). Zusätzlich tauchen vollautomatisch in der Tabelle (③) die gewählten Spektren spaltenweise aufgetragen auf (Abb. 5-22 A). Erst danach lassen sich die drei entscheidenden Panels (proceeding ④, HCA ⑤, PCA ⑥) verwenden.

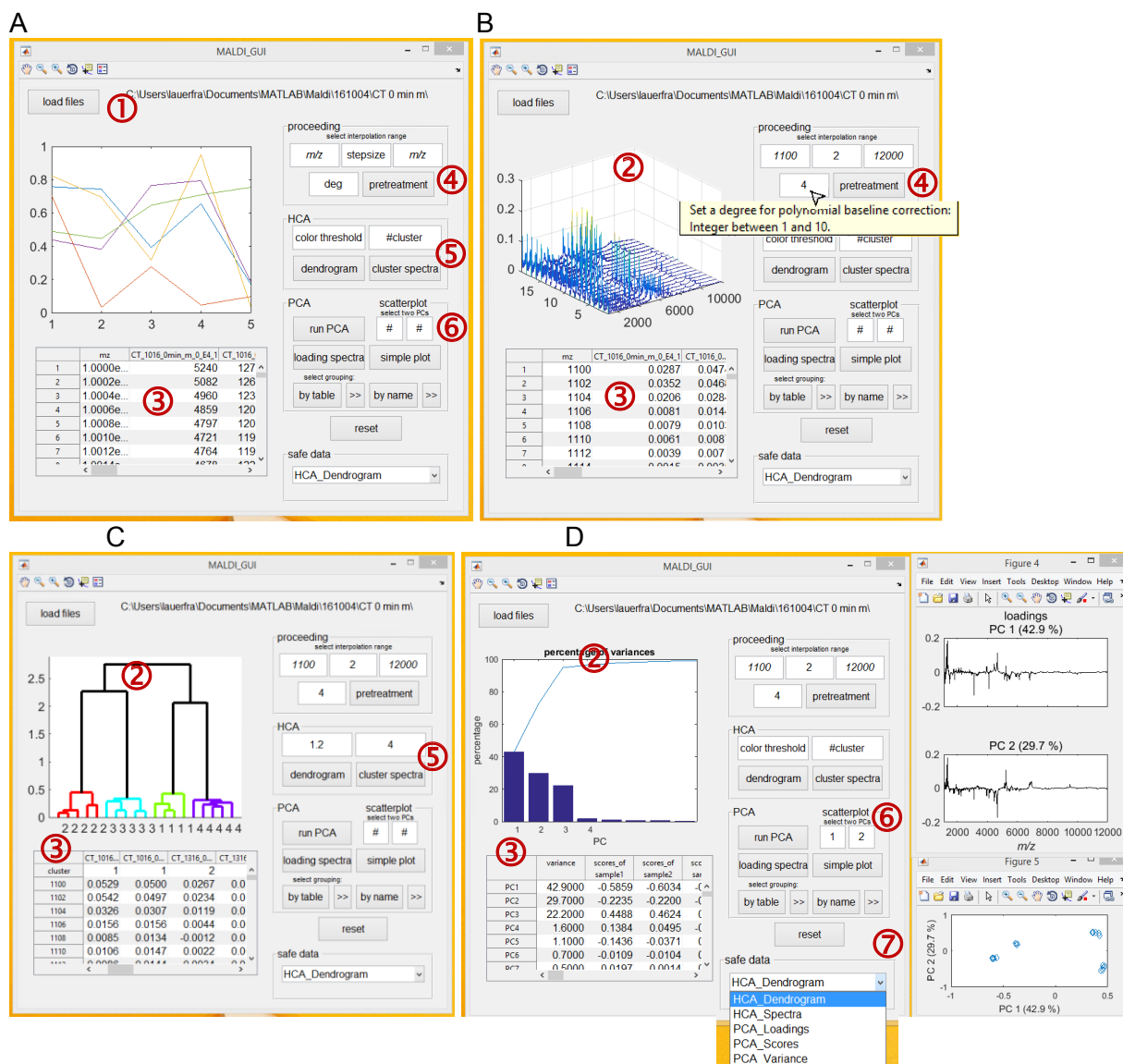


Abbildung 5-22: Gezeigt sind verschiedene Rechenschritte in der Ausführung der GUI: (A) der Upload der Spektren, (B) die Aufbereitung der Spektren über das proceeding, (C) die Ausführung einer HCA, (D) die GUI nach Ausführung einer PCA und zusätzlich gezeigt wird das Dropdown-Menü für die externe Speicherung der Daten.

B. Im proceeding-Panel ④ kann der GUI-Anwender über die weißen, editierbaren Text-Boxen den gewünschten Interpolationsbereich ('m/z', 'step size') und Grad der polynomialen Basislinienkorrektur ('deg') auswählen und mit der pretreatment-Schaltfläche die entsprechende Berechnung auslösen. Überdies gibt es erklärende Textfelder, die auftauchen, wenn der Mauszeiger über die jeweiligen grafischen Objekte geführt wird (Abb. 5-22 B). Nach erfolgreicher Berechnung erscheint wiederum automatisch statt des bisher gezeigten Platzhalters im Plotfeld ② ein Wasserfalldiagramm aller Spektren (Abb. 5-22 B). Außerdem ändern sich die entsprechenden Werte in der Anzeigetabelle ③. Über die reset-Schaltfläche und die Eingabe neuer Werte in die editierbaren Text-Boxen im proceeding-Panel kann die

spektrale Vorbehandlung der eingeladenen Spektren schnell, einfach und beliebig oft wiederholt werden.

- C. Im Anschluss an diese spektrale Vorbehandlung ist es möglich, an den Spektren sowohl eine HCA als auch eine PCA-Analyse durchzuführen. Vor der Berechnung einer HCA ⑤ wählt der Anwender im Panel eine Farbgrenze für das Dendrogramm und die Anzahl der Cluster. Eine HCA ohne Gruppeneinteilung wird erzeugt, wenn die Clusteranzahl der Zahl der Spektren entspricht. Beim Auslösen der dendrogram-Schaltfläche zeigt die Diagrammfläche (②) automatisch das entsprechende HCA-Dendrogramm der Spektren mit der gewählten Farbgrenze. Jeder Zweig des Dendrogramms ist mit der jeweiligen Clusternummer beschriftet (Abb. 5-22 C). Zudem ändert sich die Tabelle (③) wiederum adäquat.
- D. Unabhängig von der HCA lässt sich die PCA ⑥ nach dem proceeding mit der run PCA-Schaltfläche ausführen, sodass ein Pareto-Plot der totalen Varianz (②) entsteht und die Tabelle (③) dann Varianzen, Scores der einzelnen Spektren und im rechten Teil der Tabelle die Loading-Vektoren anzeigt (Abb. 2-22 D). Die Diagramme für die Loading-Vektoren (Schaltfläche - loading spectra) und das einfache Streudiagramm (Schaltfläche - simple plot) der Scores öffnen sich in separaten Fenstern, wobei zuvor über die weißen Textfelder zwei PC ausgewählt und über die jeweilige Schaltfläche betätigt werden müssen (Abb. 5-22 D). Dies lässt sich für alle gewünschten Linearkombinationen der PCs beliebig oft wiederholen. Sollte wie im Fall der Optimierung der Probenpräparation (Kapitel 5.1.2.4) noch eine Gruppierung der Spektren in den Scores-Plots dazukommen, gibt es im unteren Teil des PCA-Panels zwei weitere Varianten, die Spektren zu gruppieren und sich über die >>-Schaltfläche die entsprechend Scores-Plots anzusehen.
- Abschließend lassen sich über das Dropdown-Menü im safe data-Panel ⑦ Grafiken, Gruppierungen oder Tabellen extern ausgeben und abspeichern (Abb. 5-22 D).

Die spektrale Auswertung beliebiger MALDI-MS Daten mit Hilfe der entwickelten GUI und deren unterschiedlichen Funktionen und Wahlmöglichkeiten bietet einen schnellen Überblick über die Messdaten. Die GUI lässt sich über einen Compiler als stand-alone-Anwendung abspeichern und über *Matlab run time*-Freeware direkt auf dem Instrumentenrechner einsetzen. So kann bereits während der Messung die Qualität der Spektren beurteilt werden. Zudem lässt sich die Auswertung mehrerer Datensätze in einer solchen GUI systematisieren und vereinheitlichen. Die Kompilierung der Code-Sequenz ermöglicht ferner die Anwendung der GUI durch unterschiedlichste Nutzer, die die Programmierungen und Berechnungen nicht im Detail nachvollziehen müssen, und erhöht so die Reproduzierbarkeit der Auswertungen.

## 5.2 MALDI-TOF MS von Mischungen von Pollenkörnern

### 5.2.1 Einfluss der Anzahl von Pollenkörnern einer Spezies

Im Gegensatz zu bisher gezeigten Messungen stellen sich bei der Untersuchung von Mischproben, bestehend aus Pollenkörnern mehrerer Pflanzenarten neue Anforderungen. Die größte Herausforderung bestand darin, einzelne Pollenkörner selektiv messen zu können. Eine weitere Aufgabe war es, zu untersuchen, inwieweit die in der Massenspektrometrie häufig beobachtbare Suppression einzelner Peaks in Analytmischungen vermieden werden kann.

Dazu wurde in einem ersten Experiment die Empfindlichkeit der MALDI-TOF MS für den Nachweis von einzelnen Pollenkörnern untersucht. Auf mehreren Punkten eines mit leitfähigem Klebeband ausgerüsteten Targets wurde eine abnehmende Anzahl von Pollenkörnern ( $P = >10 - \geq 1$ ) aufgetragen und mit der HCCA/TFA-Matrixlösung überschichtet. Die gemessenen, interpolierten, basislinienkorrigierten Mittelwerts-Spektren jeder Probe, hier noch separat gemessen, sind in Abbildung 5-23 dargestellt.

Wie bereits in den vorangegangenen Messungen (Kapitel 5.1.2.4 Optimierung der Probenpräparation) sind in dieser Abbildung 5-23 erneut für jede Pflanzenart individuelle Peakmuster in verschiedenen Bereichen der Massenspektren zu sehen:

*C. avellana*: Abb. 5-23 A, Peaks bei  $m/z$  2944, 4104 und von  $m/z$  5200-6894

*A. cordata*: Abb. 5-23 B, Peaks bei  $m/z$  von 3444, 5210, 5602 und 6884

*P. sylvestris*: Abb. 5-23 C, Peaks im unteren Massenbereich  $m/z$  3947-4658

Für die Proben *C. avellana* (Abb. 5-23 A) und *A. cordata* (Abb. 5-23 B) werden bereits bei Messung eines einzelnen Pollenkorns die bereits beobachteten individuellen Peakmuster erzeugt. Im Gegensatz dazu weisen die Spektren einer geringen Anzahl von *P. sylvestris* Pollenkörnern (Abb. 5-23 C,  $P = 1, 3, 5$ ) weniger intensive und z.T. unterschiedliche Signale auf.

Generell ist in Abbildung 5-23 jedoch zu beobachten, dass eine größere Anzahl an Pollenkörnern zu einer Zunahme der Peak-Intensitäten bei gleichzeitiger Abnahme des Rauschens führte. Darüber hinaus sind im höheren Massenbereich von  $m/z$  9000 bis 12000 weitere kleine Peaks sichtbar.

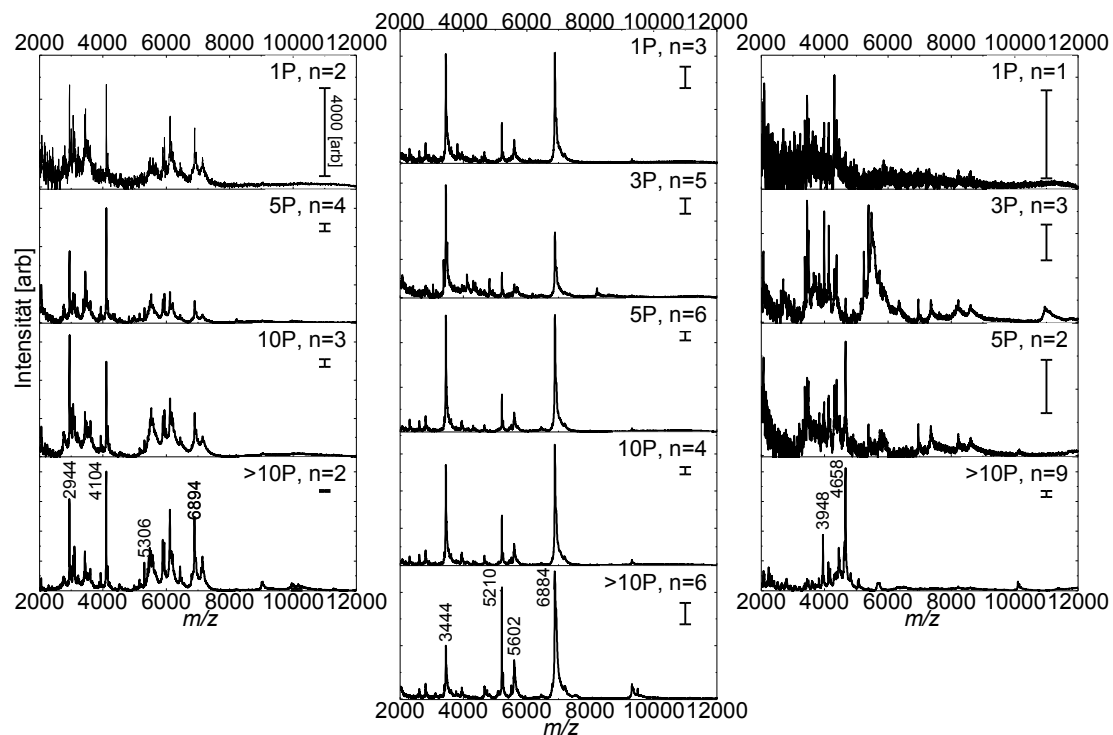
A) *Corylus avellana*  
(*C. avellana*)B) *Alnus cordata*  
(*A. cordata*)C) *Pinus sylvestris*  
(*P. sylvestris*)

Abbildung 5-23: (A-C) Mittelwerts-Spektren, wobei n für die Anzahl der interpolierten, basislinienkorrigierten, gemittelten Spektren steht, ausgewählter Pollenproben mit unterschiedlicher Anzahl von Pollenkörnern (P).

### 5.2.2 Einfluss der Anzahl von Pollenkörnern verschiedener Spezies in Mischungen

Basierend auf diesen Ergebnissen folgte ein weiteres Experiment, in dem die zuvor untersuchten Pollenproben der drei Spezies gemischt auf einen Probenpunkt aufgetragen wurden. Insgesamt befanden sich auf jedem Spot 10 Pollenkörner. Dabei wurde jedoch die Anzahl der Pollenkörner einer Spezies jeweils von 0-10 variiert. So ergaben sich 66 Messpunkte, die zur klareren Darstellung in einem simulierten Mischdreieck (Abb. 5-24 A) angeordnet und ausgewertet wurden. Zur besseren Interpretation sind alle untersuchten Spezies nachfolgend farblich gekennzeichnet: blau für *C. avellana*, rot für *A. cordata*, und gelb für *P. sylvestris*.

Die in Abbildung 5-24 (B-D) dargestellte Sortierung der 66 Spektren von 10 nach 0 Pollenkörnern einer Spezies zeigt je nach Perspektive unterschiedliche Trends. In Spektren mit einer hohen Anzahl von *C. avellana*- (Abb. 5-24 B) beziehungsweise *A. cordata*-Pollenkörnern (Abb. 5-24 C), wie z.B. in Mischungen von 10:0:0, 9:1:0 oder 9:0:1 sind erneut die zuvor beschriebenen individuellen Peakmuster sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigen die ersten Spektren, die mit einer hohen Anzahl von *P. sylvestris* Pollenkörnern (Abb. 5-24 D) aufgenommen wurden, geringe Intensitäten. Dies spiegelt sich im TIC-Dreieck (Abb. 5-24 E)



wider. Dieses weist im Bereich mit hoher *P. sylvestris*-Pollenkornanzahl (rechte Ecke) lediglich eine geringere Intensität auf, während in der linken Ecke, die den Bereich mit hoher *C. avellana*-Pollenkornanzahl repräsentiert, die Summe der Signalintensitäten um ein dreifaches höher ist.

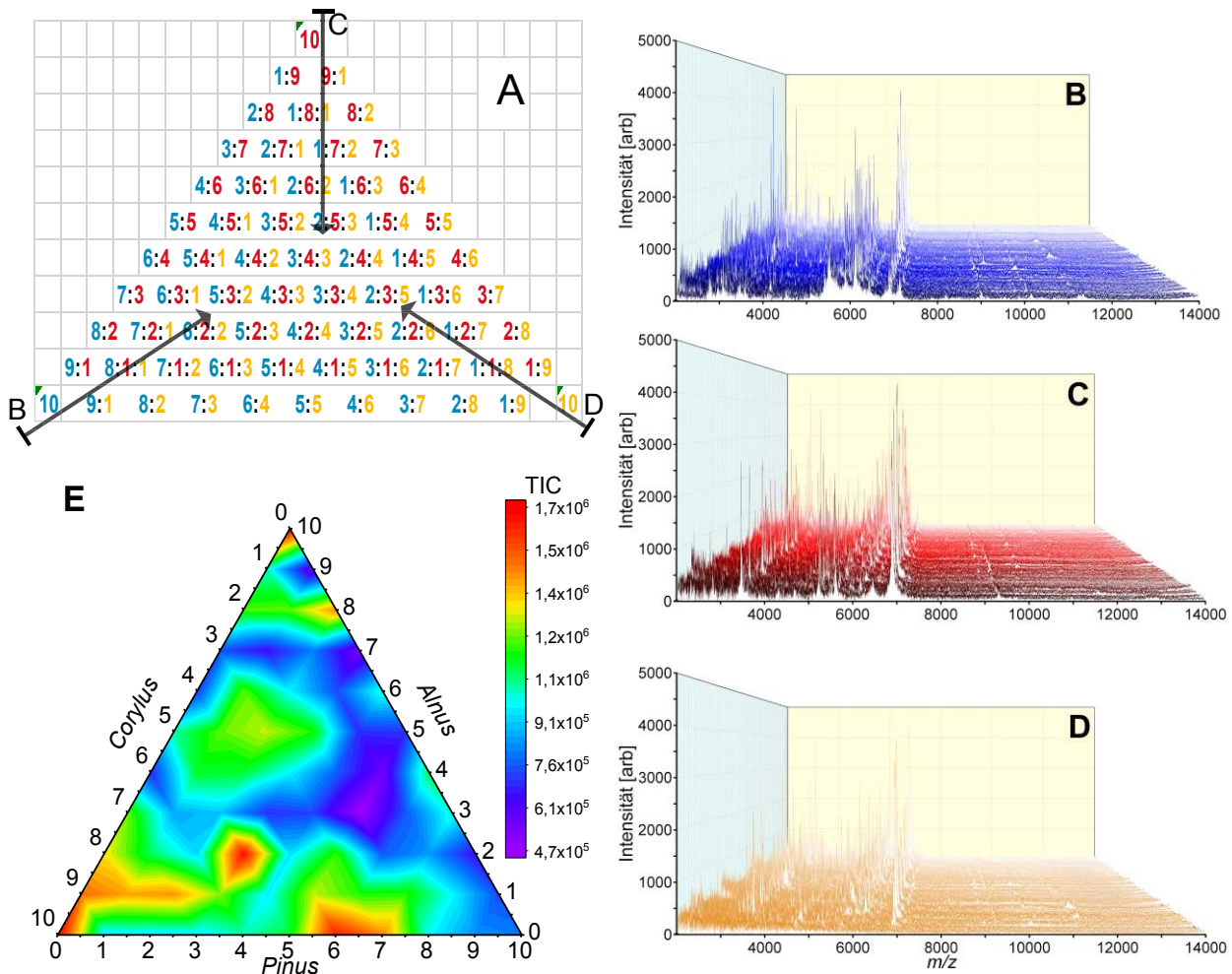


Abbildung 5-24: (A) Darstellung der 66 möglichen Kombinationen von Probenpunkten aus einer 3-er Mischung von jeweils 0-10 Pollenkörnern einer Spezies. Die 66 gemessenen, interpolierten und basislinienkorrigierten Spektren sind jeweils nach abnehmender Anzahl von Pollenkörnern für (B, blau) *C. avellana*, (C, rot) *A. cordata* oder (D, gelb) *P. sylvestris* angeordnet; (E) Darstellung des TIC der 66 Spektren.

Da der TIC der Spektren lediglich die Summe aller Signale abbildet, die Intensitätsverhältnisse der Signale eines Spektrums jedoch außer Betracht lässt, wurde in der folgenden Abbildung 5-25 die Intensität (TIC normiert) einzelner, für die jeweilige Spezies typischer Massen dargestellt. Dabei lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Alle Ionendichte-Plots weisen unabhängig von der Farbe) eine Wichtung hin zu der Ecke auf, die den Spektren mit der größten Anzahl an Pollenkörnern dieser Art in den

Mischungen entspricht. So ist die Masse  $m/z$  2942 (*C. avellana*) am intensivsten in der linken Ecke (Abb. 5-25 A), in der die Spektren der Mischungen mit vielen *C. avellana* Pollenkörnern aufgetragen wurden. Gleiches ist für die Massen  $m/z$  5204 (*A. cordata*, obere Ecke in Abb. 5-25 E) und  $m/z$  4652 (*P. sylvestris*, rechte Ecke in Abb. 5-25 I) erkennbar.

2. Zwischen diesen Punkten hoher Intensität lässt sich kein linearer Trend erkennen, der mit einer abnehmenden Anzahl von Pollenkörnern korreliert. Dies ist möglicherweise auf die Suppression einzelner charakteristischer Massen zurückzuführen.
3. Zwischen den Ecken der Ionendichtedreiecke finden sich Punkte, die, trotz einer geringeren Anzahl von Pollenkörnern einer Spezies, eine überraschend hohe Intensität speziesspezifischer Massen aufweisen. So wurde im Dreieck G (Abb. 5-25) eine Position hervorgehoben, die dem Spektrum einer Mischung aus 5 *C. avellana*-, 2 *A. cordata*- und 3 *P. sylvestris*-Pollenkörnern (5:2:3) entspricht. Dieses Spektrum zeigt für die Masse  $m/z$  4100 (*C. avellana*, Abb. 5-25 B) ein Intensitätsmaximum. Dagegen weisen die Nachbarspektren (6:2:2, 5:3:2, 4:3:3, 4:2:4, 5:1:4 und 6:1:3), die nur geringfügig unterschiedliche Pollenzusammensetzungen enthalten, deutlich geringere Intensitäten bei der gleichen Masse auf. Dieses Ergebnis verdeutlicht das bereits beschriebene Problem der Peak-Suppression in Mischungen, deren Ursache bis heute überwiegend ungeklärt ist.
4. Die *P. sylvestris* Signale  $m/z$  3940 und 4652 (Abb. 5-25 H, I) weisen in allen Mischungen geringe Intensitäten auf. Diese sind in vielen Spektren meist so klein, dass sie sich nur geringfügig vom Rauschen abheben. Dadurch werden die charakteristischen *A. cordata* bzw. *C. avellana* Massen selbst in Mischungsspektren, die außer *P. sylvestris* lediglich eine weitere Spezies enthalten, überproportional stark dargestellt.

Da die so dargestellte Auswertung der 66 Mischungsspektren, die lediglich einzelne charakteristische Pollenmassen betraf, zu einer gewissen Dominanz von Massen einzelner Spezies führte, wurde der gesamte Datensatz im Folgenden multivariat ausgewertet.

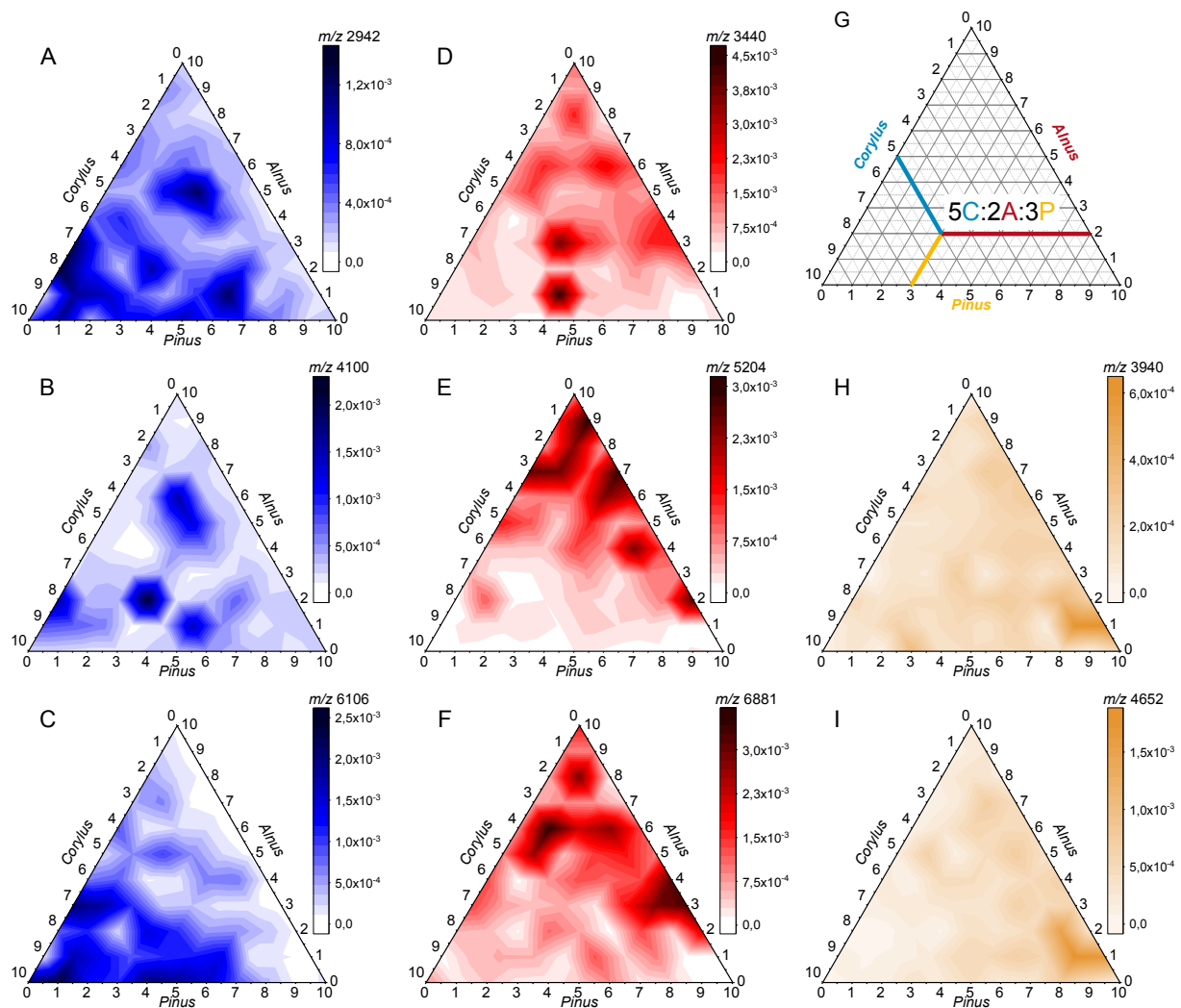


Abbildung 5-25: TIC-normierte Ionendichte für einzelne Peaks aus der Serie der 66 Mischungsspektren: charakteristische Massen für *C. avellana* in blau mit  $m/z$  (A) 2942, (B) 4100 und (C) 6106, für *A. cordata* in rot mit  $m/z$  (D) 3440, (E) 5204 und (F) 6881 und für *P. sylvestris* in gelb mit  $m/z$  (H) 3940 und (I) 4652.

### 5.2.3 Multivariate Auswertung des simulierten Mischdreiecks

Das hier gewählte Verfahren zur multivariaten Auswertung heißt nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF), welches auf einer Low-Rank-Approximation des Merkmalsraums basiert. Neben der Reduzierung der Anzahl der Variablen garantiert die NMF, dass ausschließlich positive Faktorwerte und -ladungen erzeugt werden, wodurch ein additiv gewichtetes Modell entsteht. Ausgehend vom Merkmalsraum, hier eine  $m \times n$ -Matrix und einem festgelegten Wert  $k$ , der nicht kleiner als  $\min(m, n)$  sein darf, berechnet die NMF zwei nicht-negative Matrizen. So errechnet sich zum einen eine  $m \times k$ -Matrix ( $W$ , Faktorwerte je Probe) und zum anderen eine  $k \times n$ -Matrix ( $H$ , Faktorenladung).  $W$  repräsentiert dabei die Transformationen der Variablen und  $H$  die Koeffizienten der linearen Kombinationen der

ursprünglichen Variablen aus dem Merkmalsraum. Da eine solche Faktorisierung nicht exakt ist, sind  $W$  und  $H$  so gewählt, dass der quadratische Rest ( $D$ ) zwischen dem ursprünglichen Merkmalsraum und  $W \cdot H$  minimiert wird. Da  $k$  im Allgemeinen kleiner als der Rang im Merkmalsraum ist, liefert das Produkt aus  $W$  und  $H$  eine komprimierte Approximation der Daten. Aufgrund der für die 66 Mischungsspektren verwendeten drei Spezies fiel die Wahl für den Wert von  $k$  auf 3. Ein kleiner Nachteil der in der Matlab Statistik und Maschinelles Lernen Toolbox™ enthaltenen `nnmf`-Funktion ist die Verwendung eines iterativen Algorithmus, der mit zufälligen Anfangswerten für  $W$  und  $H$  beginnt. Da der quadratische Rest  $D$  lokale Minima haben kann, können sich bei wiederholten Aufrufen der `nnmf`-Funktion leicht unterschiedliche Faktorisierungen ergeben.

Abbildung 5-26 stellt die Ergebnisse der NMF Berechnung dar. In A sind zunächst die Faktorenladungen aufgetragen und nach Analyse der Peaks farblich den passenden Proben zugeordnet. So zeigen der Ladungsvektor für  $k=1$  (Abb. 5-26 A, rot) *A. cordata*-typische Peaks bei  $m/z$  3440, 5204, 6880 und der Vektor für  $k=3$  (Abb. 5-26 A, blau) die *C. avellana*-charakteristischen Peakstrukturen ( $m/z$  2942, 4100, 6108). Im Gegensatz dazu ist der Vektor (Abb. 5-26 A, gelb) des Faktors  $k=2$  auffällig, da zum einen die normierte Intensität nur halb so hoch ist und zum anderen ein recht hohes Rauschen im unteren Massenbereich abgebildet wird. Dennoch sind in diesem Ladungsvektor einige *P. sylvestris*-typische Peaks, wie  $m/z$  3942 oder 4652 in geringen Intensitäten vorhanden.

Wenn man berücksichtigt, dass es sich bei der NMF um eine Approximation der Daten handelt, sollten die drei Faktorwerte aus der  $W$ -Matrix eines Spektrums optimalerweise 1 ergeben. Damit lassen sich diese Werte als Häufigkeitsverteilung in dem bereits verwendeten simulierten Mischdreieck darstellen (Abb. 5-26 B-D). Hier werden die zuvor aus den Ionendichte-Plots gemachten Beobachtungen (1-4) noch deutlicher. Erneut nehmen die Faktorwerte zur jeweiligen Ecke im Dreieck zu. Hier ist erneut keine eindeutige, lineare Korrelation zwischen Häufigkeit des Faktors und Anzahl an Pollenkörnern zu finden. Zusätzlich sind in  $k=1$  und  $k=3$  hohe Faktorwerte hin zur rechten Seite des Dreieckes zu erkennen, selbst wenn sich die Anzahl der *A. cordata*-( $k=1$ )- respektive *C. avellana*-( $k=3$ )-Pollenkörner reduziert.

Über die Häufigkeitsverteilung der NMF-Faktorwerte kann jedoch die Ursache der bislang weißen Bereiche, wie beispielsweise das 6:2:2-Spektrum für  $m/z$  6108 in Abb. 5-23 C, besser erklärt werden. Entscheidend dafür ist, wie das Verhältnis aller drei Faktorwerte an der Position des Spektrums ist. So weist das 6:2:2-Spektrum kaum *C. avellana*-typische Peaks:  $k=3$  = Faktorwert von 0,18 und keine *A. cordata*-spezifischen Signale:  $k=1$  = Faktorwert von 0,01 auf. Wie in Abb. 5-26 zu sehen, zeigen die Plots B und D an dieser Position daher

geringe Intensitäten. Da die Summe der k-Werte 1 betragen sollte, ergibt sich für *P. sylvestris* an dieser Position ein Faktorwert für k 2 von 0,79.

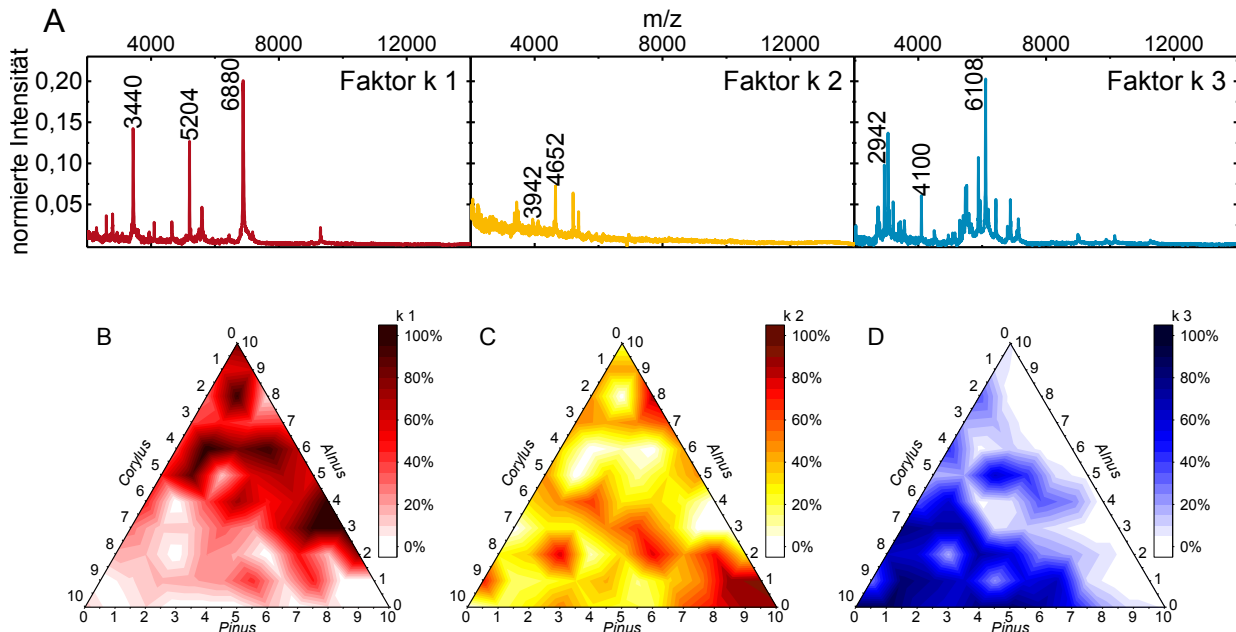


Abbildung 5-26: (A) Die H-Matrix der nicht-negativen Matrix-Faktorisierung der Serie der 66 Mischungsspektren zeigt Faktorenladung für k 1 bis k 3. (B-D) Die W-Matrix der NMF enthält die dazugehörigen Faktorenwerte jedes Spektrums, welche für k 1 bis k 3 jeweils im simulierten Mischdreieck illustriert worden.

Weitere Spektren, die nur geringe maximale Peak-Intensität und intensive Rauschsignale enthalten, zeigen ähnliche Faktorwerte für k 2 wie z.B. 0,50 bei Mischung von 1:7:2 oder 0,62 bei 0:7:3 (Abb. 5-26 C, 7 A. *cordata*). Die Faktorwerte von k 2 im Bereich von 0,4 - 0,79 zeigen an in welchen Spektren kaum Signale bzw. Rauschen gemessen wurden. Andererseits lassen sich über hohe k2 Werte von über 0,8 insbesondere *P. sylvestris*-spezifische Bereiche finden. So sind die Faktorwerte für k 2 bei einer hohen Anzahl von *P. sylvestris*-Pollenkörnern mit 0,91 (1A:9P), 0,87 (1C:9P) oder 0,89 für 10 *P. sylvestris*-Pollenkörnern am höchsten (Abb. 5-26 C, rechte Ecke). In diesen Fällen sind die MS Spektren nahezu identisch mit der Faktorenladung von k 2 (A).

Aus der gezeigten Untersuchung wird klar, dass es äußerst schwierig ist, Ionenintensitäten mit der Anzahl an Pollenkörnern zu korrelieren. Eine zunehmende Anzahl von Pollenkörnern führt nicht zwangsläufig zu einer Zunahme der Ionenintensitäten. Offensichtlich hat die Koexistenz anderer Pollenkörner einen deutlichen Einfluss auf das Messergebnis. So führt das Vorhandensein von Pollenkörnern, die wenig intensive Signale im MS-Spektrum aufweisen (z.B. *P. sylvestris*), in einer Mischung meist zu überproportional starken Signalen der anderen Spezies.

Die oben beschriebenen Effekte ließen sich trotz Verwendung der NMF nicht vermeiden. Allerdings verdeutlicht die Faktorisierung mit der additiven `nnmf`-Funktion den Anteil, den ein Faktor in einem Spektrum trägt. Lässt sich dieser Faktor einer Spezies zuordnen, so können zumindest Häufigkeitsverteilungen der Peakmuster in den Spektren klarer zugeordnet werden.

#### 5.2.4 Fazit

Diese Untersuchungen haben folgendes gezeigt:

1. Es ist möglich, charakteristische Spektren von Pollenkörnern in Mischungen mit MALDI-TOF MS zu messen.
2. Im Gegensatz zu den Messungen von Pollenkörnern der gleichen Spezies, die mit steigender Anzahl von Pollenkörnern intensivere Signale aufweisen, werden die Spektren von Mischungen meist durch einzelne, intensive Signale einer Pollenprobe dominiert.
3. Spezies, die nur wenige und/oder wenig intensive Signale in ihren charakteristischen Massenspektren der Pollenkörner aufweisen, sind in Mischspektren meist deutlich unterrepräsentiert.
4. Zur Untersuchung von Pollenkornmischungen ist es daher zwingend erforderlich, die Pollenkörner auf dem Spot lateral voneinander zu trennen. Dies verhindert ein Vermischen der Extrakte und kann die beschriebenen Suppressionseffekte ausschließen.

Aus diesen Gründen wurden im nächsten Abschnitt Mischungen von Pollenkörnern mit einem bildgebenden Verfahren, der MALDI-TOF Imaging Massenspektrometrie (MALDI-TOF MSI), untersucht.

### 5.3 MALDI-TOF Imaging von Mischungen von Pollen

#### 5.3.1 Variation der Matrixauftragung

Für die geplanten MALDI-TOF Imaging-Messungen an Pollenmischungen war jedoch zunächst eine Untersuchung der Art der Matrixauftragung erforderlich. Der bisher verwendete Ansatz über eine Fixierung der Pollenkörner auf einem Klebeband mit anschließender Auftragung eines 1 µl Tropfens Matrix könnte zu einer Vermischung der aus den Pollenkörner extrahierten Analyten führen (Abb. 5-27 A). Daher wurden die in Abbildung 5-27 schematisch dargestellten, alternativen Matrix-Auftragetechniken (B-E) hinsichtlich ihrer Eignung genauer untersucht. Eine von vielen Forschungsgruppen verwendete Technik besteht im Aufsprühen (Airbrush) der Matrix mit einer

handelsüblichen Strahlpumpe (B). Der Vorteil der einfachen Handhabung wird allerdings durch den hohen Verbrauch von Matrixsubstanz und die unregulierbaren Mengenverhältnisse konterkariert. Im Gegensatz dazu lässt sich die Matrixsubstanz mit Elektrospray-Auftragung gut einstellen und temperieren (C). Weniger gut funktioniert die Matrixpräparation mit Hilfe eines Siebes (500  $\mu\text{m}$ , D), bei dem die trockene, reine Matrix verwendet wird. Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass im Falle der Verwendung von HCCA zu grob aufgetragen wurde. Das Drucken von Matrixlösungen mit einem umgebauten Tintenstrahldrucker (Epson Stylus C 84, E) erwies sich als unpraktisch, da der pneumatische Druckkopf durch die schnelle Kristallisation der Matrixlösung schnell verstopfte.

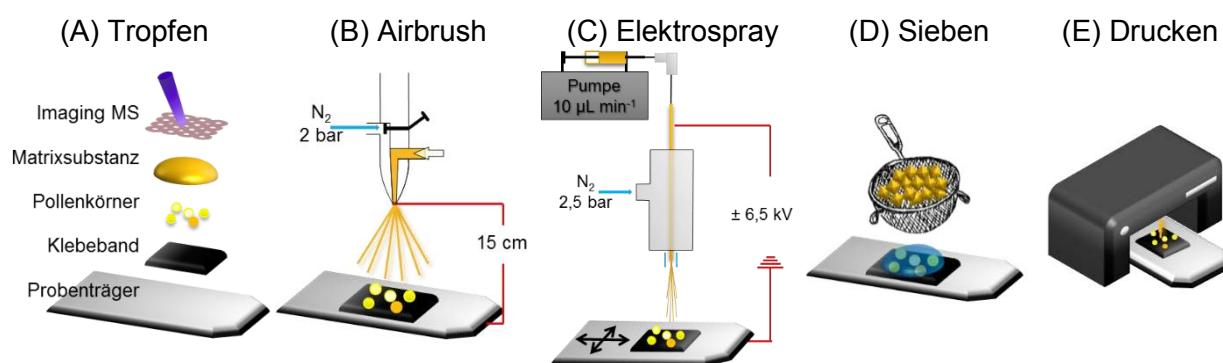


Abbildung 5-27: In Vorbereitung von Pollenproben zur MALDI-TOF Imaging-Messung werden hier mögliche Optionen zum Auftragen der Matrixsubstanz schematisch dargestellt, genauer Tropfenauftragung, Airbrushverfahren, Elektrosprayverfahren, das Sieben oder das Drucken der Matrixsubstanz.

Zum Vergleich der vorgestellten Techniken, wurde die bisher häufig verwendete *C. avellana*-Probe mit möglichst gleicher Anzahl an Pollenkörnern auf mehrere Spots aufgetragen, auf denen zuvor das doppelseitige Klebeband befestigt wurde. Nachfolgend wurde jede Matrixauftragsart mit optimierten Parametern verwendet und jeweils eine Imaging-Messung pro Spot durchgeführt. Das Airbrush-Verfahren wurde subjektiv durch die visuelle Kontrolle der Auftragung der Matrix (benetzt/ nicht nass) mit einem Abstand von 15 cm zwischen Probenträger und Airbrush-Pistole justiert. Entsprechend ähnlich wurde die Elektrospray-Auftragung optimiert. Hier erwies sich eine Flussrate von 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  bei 80°C, 2,5 bar  $\text{N}_2$  und +6,5 kV als geeignet, um eine nasse, aber nicht verlaufende Matrixspur auf dem leitfähigen Klebeband abzusetzen.

Die Positionen der Messpunkte dieser Imaging-Messungen sind in Abbildung 5-28 in der oberen Reihe durch die roten Punkte dargestellt. Zur Auswertung der Imaging-Messungen wurden alle Einzelspektren (zweite Reihe in grau) zusammen mit dem daraus resultierenden Mittelwerts-Spektrum (schwarz) abgebildet. In der unteren Reihe der Abbildung 5-28 ist die Intensität des TIC an den jeweiligen Messpunkten dargestellt.



In Abbildung 5-28 fällt auf, dass lediglich in Spektren, die nach Tropfenauftragung der Matrix gemessen wurden, klare *C. avellana*-typische Peakmuster zu erkennen sind (A). Diese befinden sich insbesondere im rechten oberen Bereich und in der Mitte der Probe (A, 3.te Zeile, TIC Darstellung).

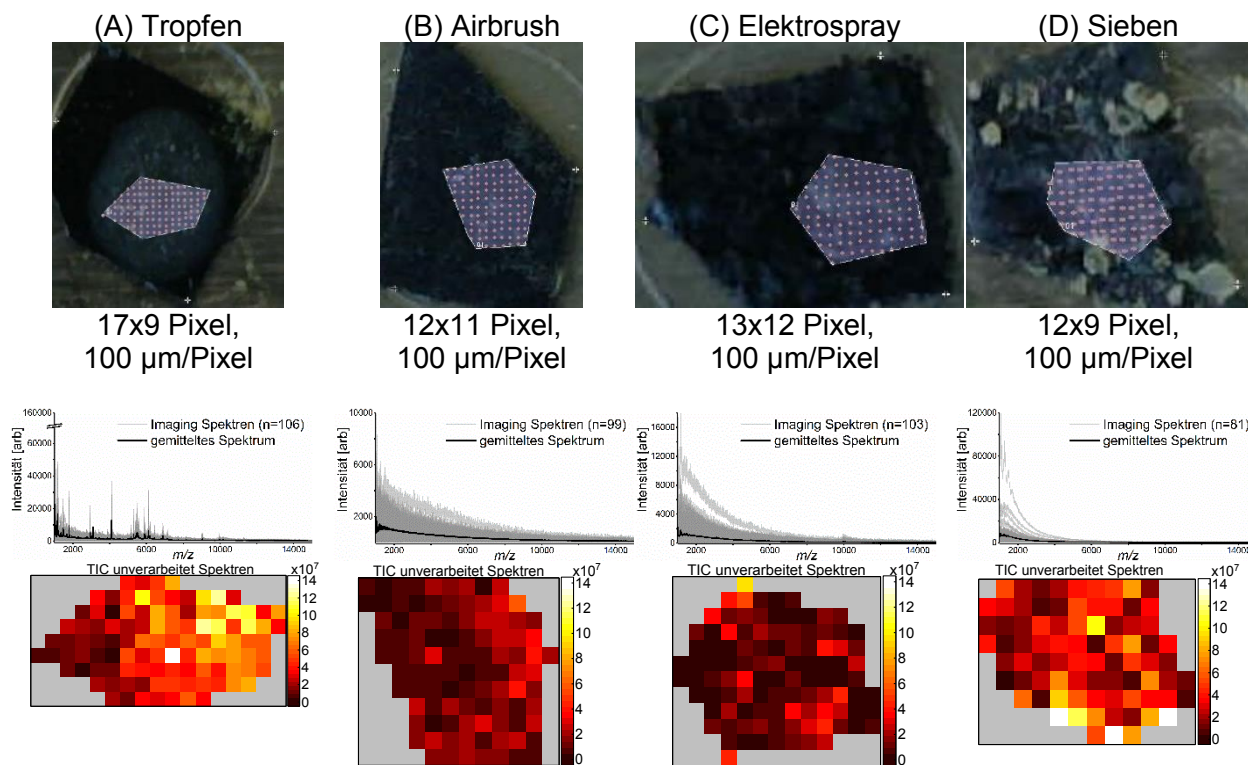


Abbildung 5-28: Imaging-Messungen bei vier verschiedenen Techniken der Matrixauftragung: HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O (TFA) wurde aufgetragen über (A) Tropfenpräparation, (B) Airbrushen, (C) Elektrosprays bzw. (D) trockenem Sieben. Die erste Zeile zeigt den gemessenen Bereich, die Zweite die gemessenen Spektren und in der dritten Zeile ist der TIC bezogen auf die Position des jeweiligen Spektrums dargestellt.

Diese Untersuchung zeigt auch, dass die anderen Techniken (insbesondere B und C) zu keiner sichtbaren Extraktion der Analyten der *C. avellana*-Probe in der Lage waren. Da bei diesen Verfahren das LSM bereits größtenteils während der Präparation verdunstete, ist vermutlich die zur Extraktion notwendige Zeit zu kurz, um Analyten von der Oberfläche der Pollenkörner zu lösen. Hier wäre eventuell eine anschließende Befeuchtung nötig, um bessere Ergebnisse zu erzielen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass diese alternativen Ansätze ohne weitergehende Präparationsschritte für eine schnelle MSI-Messung von Pollenkörnern nicht geeignet sind. Daher wurde in den nachfolgenden MALDI-TOF MS Imaging-Experimenten die Tropfenpräparation trotz der erwähnten Nachteile verwendet.



### 5.3.2 MALDI-TOF MS Imaging

Im diesem Abschnitt werden Ergebnisse diskutiert, die durch die Kombination der bereits vorgestellten vereinfachten Probenpräparation mit der bildgebenden Massenspektrometrie erhalten wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den zuvor erhaltenen Daten wurden wiederum Mischungen von Pollenkörnern der drei Spezies *Alnus cordata*, *Corylus avellana* und *Pinus sylvestris* präpariert und mit MALDI-TOF Imaging MS (MSI) analysiert. Die Untersuchungen erfolgten bei zwei verschiedenen lateralen Auflösungen mit dem Ziel, die zuvor beobachtete Peakunterdrückung in den MALDI-TOF Massenspektren von Gemischen zu verhindern und einen möglichen Einfluss der Pollengröße auf die Analyse genauer zu bestimmen. [313-316] Die Auswertung erfolgte wiederum unter Zuhilfenahme chemometrischer Methoden. [190, 197] So wurde die hierarchische Clusteranalyse (HCA) zur Klassifizierung der gemessenen Mischungen verwendet und ferne der jeweilige Imaging-Datensätze zusätzlich über die Hauptkomponentenanalyse (PCA) verifiziert. Auf Basis von unabhängigen Referenzspektren wurde abschließend eine Identifizierung von Pollenkörnern durchgeführt.

#### 5.3.2.1 MALDI-TOF Imaging MS mit 100 µm Auflösung

In einer ersten Untersuchungsreihe, mit Pollenkornmischungen von jeweils 10, 5, 3 und 1 Pollenkörnern der drei Arten, wurden die MSI-Messungen mit einer Auflösung von 100 µm durchgeführt. Die laterale Auflösung im MALDI-TOF MSI wird durch den Punkt-zu-Punkt-Abstand des Laserpulses definiert.

Vor dem Imaging wird ein optisches Bild (Mikroskopbild) der zu messenden Stelle aufgenommen. Dieses dient in erster Linie dazu, später beide Bilder überlagern zu können. Damit können die Ergebnisse der Massenspektrometrie Objekten oder Strukturen im optischen Bild zugeordnet werden. Eine klare Visualisierung der einzelnen Pollenkörner mit Hilfe der Mikroskopkamera war jedoch meist unmöglich, da der Klebefilm des zur Fixierung der Pollenkörner verwendeten leitfähigen Carbonklebebands unter dem Auflichtmikroskop zu stark reflektierte. Dies wurde zusätzlich durch die Übersichtung der Pollenkörner mit der HCCA-Matrix erschwert.

In Abbildung 5-29 sind die Ergebnisse des MALDI-TOF MSI einer Mischung der 3 Spezies mit jeweils 10 Pollenkörnern, dargestellt. Die Imaging-Spektren wurden an den durch rote Punkte (Abb. 5-29 A) symbolisierten Stellen aufgenommen. Die gemessenen Spektren wurden, wie in Kapitel 4.6 beschrieben, vorbehandelt und nachfolgend über die HCA ausgewertet. In einer HCA wird ein Datensatz nach Ähnlichkeiten hinsichtlich der spektrometrischen Informationen (Massen + Intensitäten) in bestimmte Gruppen (Cluster)

sortiert. Konkret wurden die 88 Imaging-Spektren dieser Pollenkornmischung jeweils einem von vier Clustern zugeordnet. Die Verfahrensweise zur Clustervalidierung wird an späterer Stelle genauer beschrieben. In Abbildung 5-29 B sind sowohl die gemittelten Spektren jedes Clusters (farbig) als auch die Einzelspektren (grau) sowie deren Anzahl (n) im entsprechenden Cluster dargestellt. Abbildung 5-29 C zeigt darüber hinaus die Zuordnung der Clusterklassen zur Position, an der das Spektrum aufgenommen wurde.

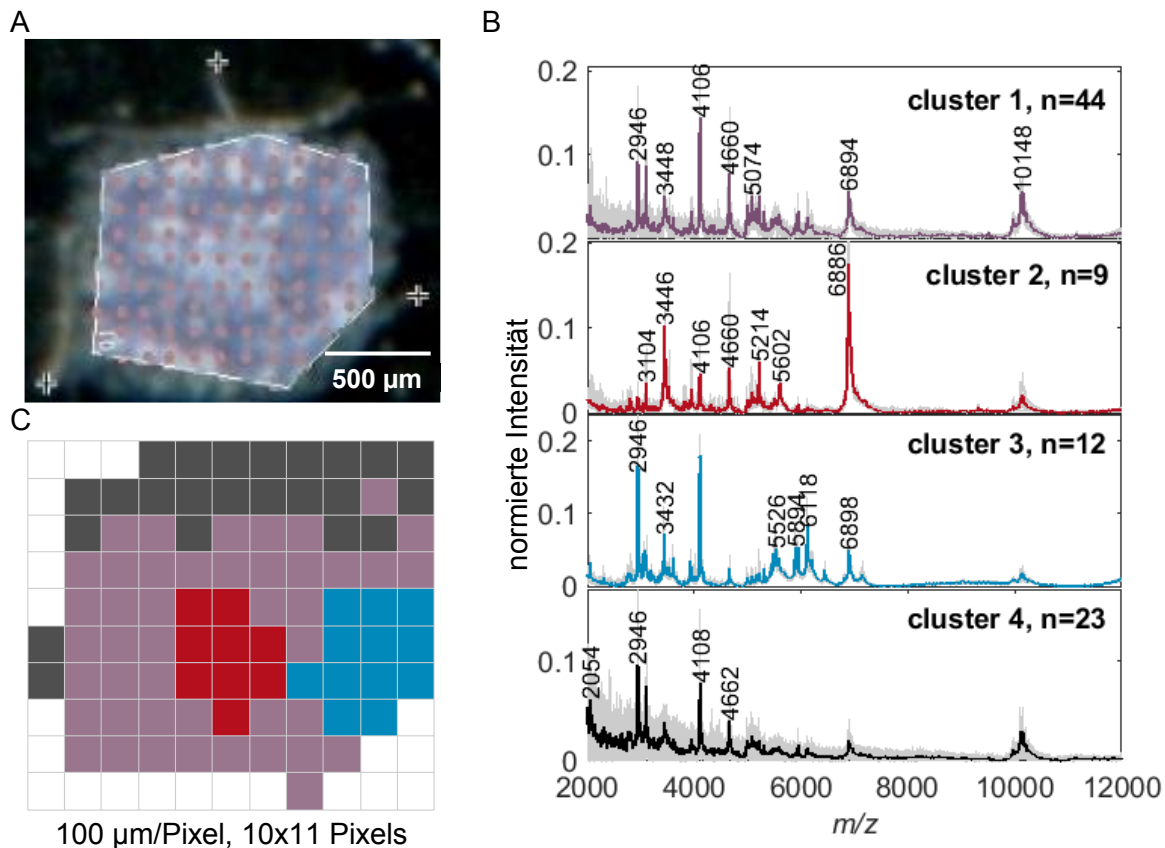


Abbildung 5-29: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils *zehn* Pollenkörnern, Laserpunktabstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der vier größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums.

Bei Betrachtung der mit Massenzahlen annotierten Peaks der Spektren (Abb. 5-29 B), die zur Erzeugung von Cluster 1 (violett) verwendet werden, fällt auf, dass dieses Cluster Peak-Informationen von allen drei Spezies enthält. Eindeutige spektrometrische Unterschiede zwischen den Mittelwerts-Spektren gibt es dagegen in den Clustern 2 und 3 (rot und blau). Das gemittelte Spektrum von Cluster 2 (rot) zeigt ein *A. cordata*-spezifischeres Peakmuster, während die Spektren aus Cluster 3 (blau) den Spektren von *C. avellana* ähnlich sind.

Ein Blick auf die Positionen dieser zugeordneten Clusterspektren auf dem Probenpunkt (Abb. 5-29 C), zeigt eine Anreicherung von *A. cordata*-Pollenkörnern in der Bildmitte (rot), während *C. avellana*-Pollenkörner (blau) eher im rechten Bereich des

Probenpunktes zu finden waren. Im Gegensatz dazu stellt Cluster 4, dessen Spektren hauptsächlich ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen (Abb. 5-29 B), einen Übergangsbereich zwischen Pollenextrakt und Hintergrund dar (Abb. 5-29 C, dunkelgrau). *P. sylvestris*-spezifische Peakmuster konnten nicht gefunden werden.

In den folgenden Experimenten wurde die Menge der Pollenkörner schrittweise reduziert. Die Ergebnisse der Analyse einer Mischung aus fünf Pollenkörnern jeder der drei Arten sind in Abbildung 5-30 dargestellt. Wie zu sehen ist, wurde an 93 Punkten ein Massenspektrum aufgenommen (Abb. 5-30 A).

In dieser Messung weisen die Spektren aus Cluster 1, 2 und 4 (Abb. 5-30 B) artspezifische Peakmuster (blau, violett und rot) auf, während Spektren aus Cluster 3 (schwarz) das größte Signalrauschen enthalten. So konnten beim Vergleich der Spektren aus Cluster 1 und 4 (blau und rot) verschiedene individuelle Peaks identifiziert werden, während das Mittelwerts-Spektrum aus Cluster 2 (violett) erkennbar eine Mischung aus spektrometrischen Informationen dieser beiden anderen Cluster enthält. Das gemittelte Spektrum von Cluster 1 (blau) ähnelt den *C. avellana*-Referenzspektren (vgl. Abb. 5-23 A). Im gemittelten Spektrum des Clusters 2 (violett) kann der Peak bei  $m/z$  4106 auf *C. avellana* zurückgeführt werden (vgl. Abb. 5-23 A), gleichzeitig deutet der Peak bei  $m/z$  4660 auf das Vorhandensein von *P. sylvestris* Pollenkörnern (vgl. Abb. 5-23 C) hin. Die Peaks bei  $m/z$  3446 und  $m/z$  6888 stimmen wiederum eher mit Peaks der *A. cordata*-Referenzspektren überein (vgl. Abb. 5-23 B). Im Gegensatz dazu enthält das Mittelwerts-Spektrum aus Cluster 4 (rot) eindeutige Peaks, die im Referenz-Spektrum von *A. cordata* zu finden sind (vgl. Abb. 5-23 B).

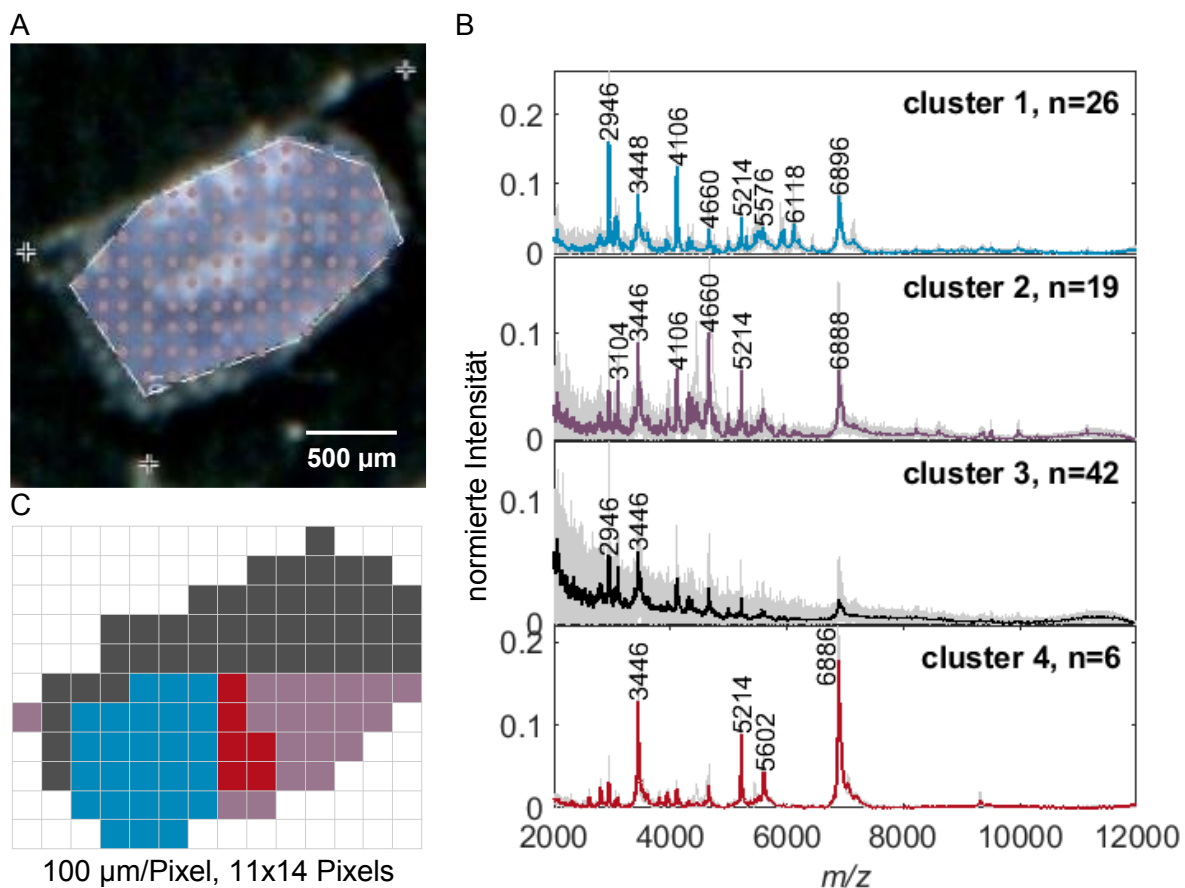


Abbildung 5-30: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils *fünf* Pollenkörnern, Laserpunkt Abstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der vier größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums.

Aus dem entsprechenden Bild der Positionen der HCA-Cluster (Abb. 5-30 C) lässt sich schließen, dass die Pollenkörner hauptsächlich im unteren Teil des Spots verteilt sind. Hier befindet sich das *C. avellana*-Pollenextrakt auf der linken Seite des Probenpunktes (blau), während daneben eine lokale Verteilung (400 × 200 µm) von *A. cordata*-Pollenkörnern (rot) messbar war. Ein weiterer Bereich auf der rechten Seite des Spots lässt sich als die oben beschriebene Mischung von Pollenextrakten (Cluster 2) klassifizieren.

Die Messdaten zu einer weiter verringerten Pollenzahl von jeweils 3 Körnern sind in Abbildung 5-31 zu sehen. Im Vergleich zum vorangegangenen Imaging-Datensatz (Abb. 5-30) sind in dieser Analyse weniger Unterschiede in den gemittelten Spektren vorhanden (Abb. 5-31 B). Cluster 1 enthält größtenteils irrelevante Signale, während in den Spektren aus Cluster 2 viele verschiedene Peaks vorhanden sind, die mit höheren Intensitäten insbesondere in Spektren aus dem Cluster 3 zu finden sind. Überdies ist im gemittelten Spektrum des Clusters 4 ein Peakmuster im Massenbereich  $m/z$  4500-5000

sichtbar. Wie ein Vergleich mit den Referenzspektren aus Abbildung 5-23 zeigt, markieren die annotierten Peaks von Cluster 2 einen Übergangsbereich zwischen gemessenem Pollenextrakt und Hintergrund, während das Cluster 3 *C. avellana*-Spektren zugeordnet werden konnte (vgl. Abb. 5-23 A). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass im blauen Bereich ( $400 \times 300 \mu\text{m}$ ) der Abbildung 5-31 C (Cluster 3) *C. avellana*-Pollenkörner vorhanden sind.

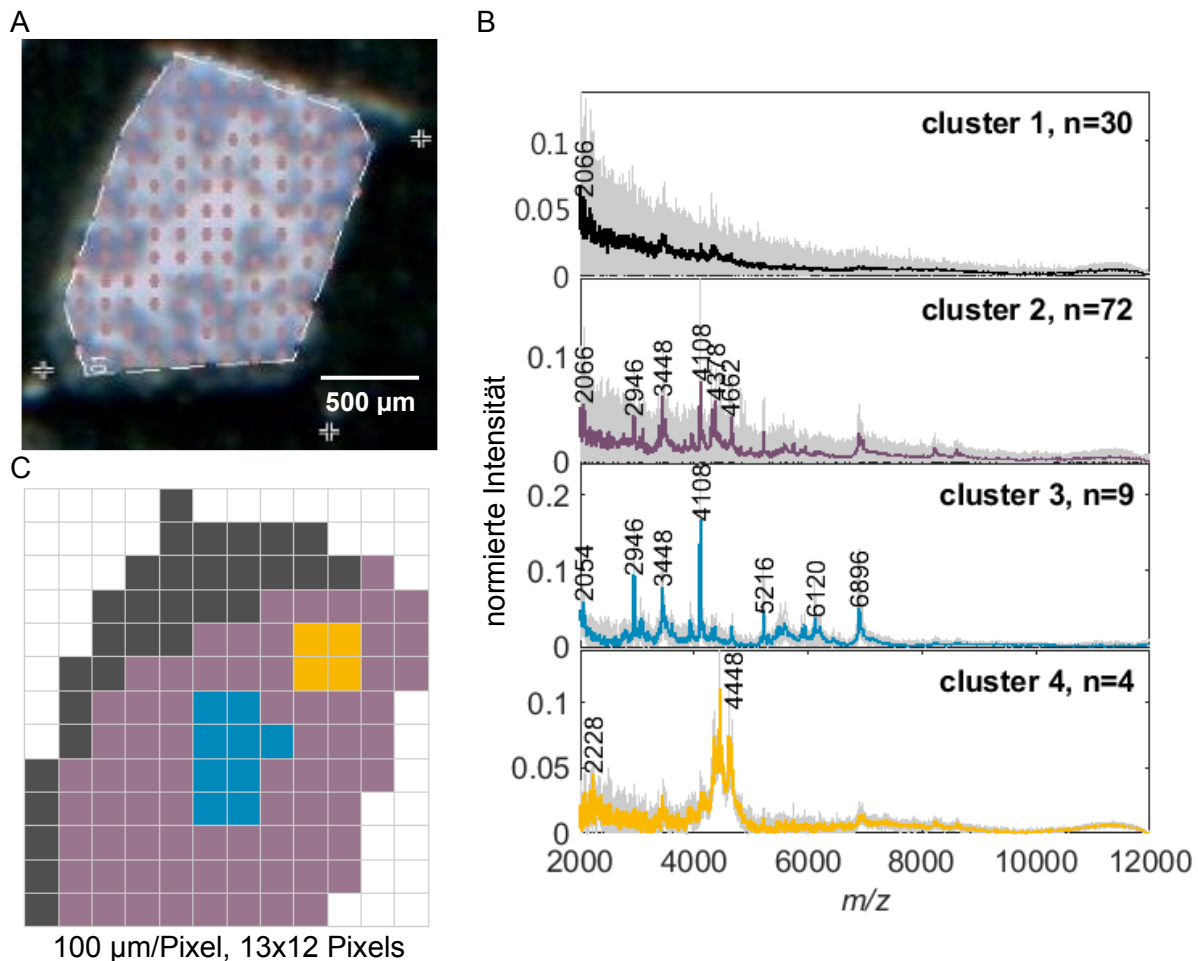


Abbildung 5-31: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils *drei* Pollenkörnern, Laserpunkt Abstand  $100 \mu\text{m}$ . (B) gemittelte Spektren der vier größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums.

Die bisherigen gezeigten Datensätze haben belegt, dass Imaging von Pollenkornmischungen möglich ist und Spektren mit zuverlässigen Peak-Informationen gewonnen werden können. Aufgezeichnete Peakmuster können durch HCA unterschieden und visuell den Referenzspektren zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine HCA dieser Datensätze ein geeignetes Werkzeug bei Vorhandensein einer größeren Anzahl von Pollenkörnern  $> 5$  ist, aber bei der Analyse weniger Pollenkörnern fehlgeschlagen ist. Ein

entscheidender Punkt ist dabei die Trennung der Messdaten von Pollenkörnern, Pollenextrakt und Hintergrundclustern.

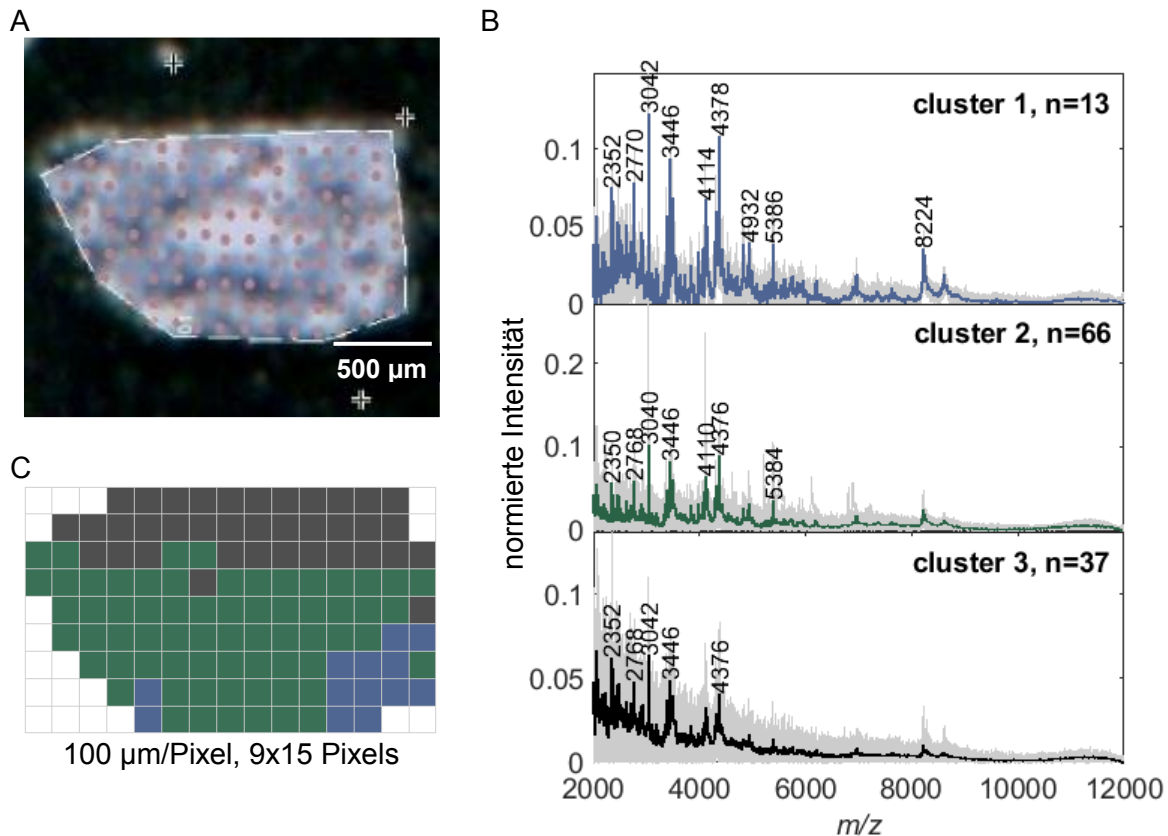


Abbildung 5-32: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils *einem* Pollenkorn, Laserpunkt Abstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der drei größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums.

### 5.3.2.2 Validierung der Clusteranzahl der gezeigten Imaging-Datensätze

Die manuelle Auswahl der Anzahl der Cluster zeigt bisher in den meisten Fällen eine klare Differenzierung der gemessenen Imaging-Datensätze. Andererseits spiegelt diese Auswahl nur eine mögliche Partitionierung der Datensätze wider, was nicht bedeutet, dass es kein anderes, noch besseres Clustering gäbe. [317]

Es existiert eine Reihe von Indices, wie der DUNN-Index oder der Silhouetten-Koeffizient, die zur Evaluation einer Clusteranalyse herangezogen werden können. Diese interne Begutachtung beruht auf der Annahme, dass Elemente im gleichen Cluster ähnlicher sein sollten als Elemente in verschiedenen Clustern. So entstehen für einen Datensatz bestimmte Qualitäts-Scores, die für eine beliebige Anzahl an Clustern berechnet werden können. Gleichzeitig sind diese Werte der größte Nachteil einer derartigen Validierung, da dabei der Fokus vorrangig auf der Ähnlichkeit des Optimierungsproblems liegt, und wenig darüber aussagt, wie die Güte eines Clusters selbst ist. Ein hoher Wert der Indices bedeutet so nicht

zwangsläufig, dass die gewählten Cluster, obwohl deutlich unterschiedlich zueinander, relevante Informationen enthalten, die zur Auswertung beitragen. Außerdem beruht die Berechnung der Indices häufig auf den gleichen entfernungsbasierten Grundlagen, wie das Clustermodell selbst, sodass es zu einem engl. *overfitting* kommen kann.

Nichtsdestotrotz wurde in der folgenden Tabelle 5-4 für die vier bereits gezeigten Datensätze (in Spalte 1/2 beschrieben) jeweils der Silhouetten-Koeffizient (SK, erste Zeile des jeweiligen Datensatzes), das Silhouetten-Maximum (S-M, zweite Zeile) und der DUNN-Index (DI, dritte Zeile) bei einer Anzahl von 2-9 HCA-Clustern (spaltenweise dargestellt) berechnet. Jedes Spektrum erhält in der Berechnung einen Silhouetten-Score von -1, d.h. das Spektrum ähnelt eher dem nächstgelegenen Cluster, bis +1, d.h. das Spektrum innerhalb des Clusters ähnlich. Im Gegensatz dazu berechnet der DUNN-Index die Ähnlichkeit nicht objektweise, sondern setzt die minimale Inter-Cluster-Distanz ins Verhältnis zur maximalen Intra-Cluster-Distanz. Ein Auswahlkriterium ist in beiden Fällen die Clusteranzahl, bei der der Wert des Index maximal wird, da dann die Cluster in sich homogen und deutlich voneinander getrennt sein sollten.

Bezogen auf die Tabelle 5-4 sind die höchsten Werte (grün markiert) für den SK (erste Zeile jedes Datensatzes) jeweils bereits bei 2 HCA-Clustern erreicht, während dieser bei höherer Anzahl stetig abnimmt. Die einzelnen Silhouetten-Werte der Spektren zeigen bei höherer Clusteranzahl häufiger ins Negative, was zu einem kleineren Mittelwert führt. Statt des niedrigen Mittelwertes ist es dann möglicherweise sinnvoller, sich den maximalen Wert aller Silhouetten (Tab. 5-4, S-M, zweite Zeile jedes Datensatzes) anzusehen. Das Spektrum mit dem maximalen Wert ist entsprechend innerhalb des eigenen Clusters ähnlich und das Cluster selbst im Datensatz besonders auffällig. Diese Werte zeigen eine deutlich höhere Übereinstimmung mit der manuell (fett) getroffenen Auswahl von Clustern.

Auf der anderen Seite enthält der DI mehr Variation (Tab. 5-4, dritte Zeile jedes Datensatzes), weil bei höherer Anzahl von Clustern ein gut abgegrenztes Cluster hinzukommen kann. Die Tabelle belegt, wie schwierig die Auswahl der ‚richtigen‘ Clusteranzahl ist. Keiner dieser Ansätze kann daher vollkommen die Qualität jedes Clusters beurteilen. Die manuelle Auswahl, obwohl subjektiv, bewegt sich entsprechend im Rahmen dieser Qualitäts-Scores.

Tabelle 5-4 Berechnung des Silhouetten-Koeffizient (erste Zeile des jeweiligen Datensatzes), das Silhouetten-Maximum (zweite Zeile) und der DUNN-Index (dritte Zeile) der vier vorangegangenen gezeigten MALDI-TOF MSI-Datensätze (Abb. 5-29, -30, -31 und -32).

Spot-to-spot Abstand: 100 µm

Pollenkorn- und Spektren- Anzahl	Cluster- Validierung	Anzahl der HCA-Cluster							
		2	3	4	5	6	7	8	9
1. 10P n = 88 Spektren (Abb. 5-29)	Silhouetten-Koeffizient	0,53	0,42	0,44	0,39	0,32	0,29	0,28	0,28
	S-Maximum	0,89	0,88	0,87	0,87	0,86	0,85	0,89	0,89
	Dunn-Index	0,38	0,40	0,32	0,32	0,32	0,32	0,35	0,37
2. 5P n = 93 (Abb. 5-30)	Silhouetten-Koeffizient	0,41	0,38	0,41	0,31	0,30	0,24	0,22	0,24
	S-Maximum	0,63	0,78	0,90	0,90	0,90	0,88	0,87	1,00
	Dunn-Index	0,39	0,23	0,28	0,28	0,31	0,27	0,27	0,34
3. 3P n = 115 (Abb. 5-31)	Silhouetten-Koeffizient	0,19	0,15	0,15	0,11	0,11	0,13	0,12	0,09
	S-Maximum	0,40	0,58	0,75	0,74	0,74	0,74	0,73	0,73
	Dunn-Index	0,53	0,55	0,64	0,64	0,69	0,69	0,69	0,69
4. 1P n = 116 (Abb. 5-32)	Silhouetten-Koeffizient	0,20	0,10	0,10	0,07	0,05	0,06	0,07	0,07
	S-Maximum	0,39	0,35	0,35	0,35	0,27	1,00	1,00	1,00
	Dunn-Index	0,60	0,51	0,53	0,53	0,53	0,64	0,64	0,64

### 5.3.2.3 MALDI-TOF Imaging MS mit 50 µm Auflösung

Wie von R.M. Heeren beschrieben, ist die räumliche Auflösung in der bildgebenden MS wichtig, um die Qualität von molekularen Bildern zu beurteilen. [174] Um möglichst viele Informationen aus den Extrakten um die Pollenkörner zu sammeln und um verschiedener Pflanzenarten nebeneinander besser unterscheiden zu können, wurde die laterale Auflösung in den folgenden Untersuchungen auf 50 µm reduziert. Darüber hinaus wurde für die Analyse der Daten neben der Klassifizierung durch HCA auch PCA verwendet.

Die in Abbildung 5-33 A gezeigte Aufnahme eines weiteren Probenpunktes mit einer Mischung der Pollenproben bei je 5 Pollenkörner wurde nun mit der höheren räumlichen Auflösung von 50 µm gemessen. Hier sind demgemäß 631 rote Punkte zu sehen (Abb. 5-33 A), die jeweils ein Massenspektrum repräsentieren. Aufgrund der höheren Auflösung und der geringen Probenmenge wurden mehrere Spektren auf dem leitfähigen Klebeband gemessen, die nur Hintergrundsignale enthielten.



Die 631 Spektren dieser Mischung sind wiederum in Abbildung 5-33 B und C in einer HCA mit insgesamt neun Clustern klassifiziert. Alle Cluster, die vorwiegend verrauschte Signale in geringen Intensitäten enthielten (535 von 631), wurden zusammengefasst (Cluster 1-5, Abb. 5-33 B). Die zweite Gruppe in Abbildung 5-33 B fasste Informationen aus zwei einzelnen Clustern (Cluster 6 + 7) zusammen, die spektrometrische Ähnlichkeiten aufweisen. Hier konnte eine Mischung aus Peakmustern verschiedener Pollenproben sowie irrelevante Signalen beobachtet werden. Darüber hinaus konnten zwei Cluster mit für *C. avellana*-(Cluster 8) und *A. cordata*-(Cluster 9) charakteristischen Peaks durch HCA unterschieden werden (Abb. 5-33 B).

Die entsprechenden Positionen der Cluster basierend auf der Zuordnung jedes Spektrums sind in Abbildung 5-33 C gezeigt. Dabei sind die Positionen der Hintergrundspektren in grau dargestellt (Cluster 1-5), während die Positionen der *C. avellana* Pollenspektren blau eingefärbt (Cluster 8) und die der *A. cordata*-Probe zugeordneten Spektren rot gefärbt wurden (Cluster 9). Außerdem sind im violetten Bereich die Spektren aus Cluster 6 und 7 abgebildet, in denen artenspezifische Masseninformationen schwer zu unterscheiden waren. Diese Regionen enthalten vermutlich ein verdünntes Extrakt mehrerer Spezies.

Bereits Deininger *et al.* und Weaver *et al.* belegen die Eignung von MALDI-TOF MS Imaging-Daten mit einer Kombination von HCA und PCA zur Gewinnung von 2D- und 3D-Informationen, um Gewebematerial auszuwerten. [318, 319]. Daher wurde an dem in Abb. 5-33 gezeigten Datensatz zusätzlich zur HCA (A-C) eine PCA (D-E) durchgeführt. Eine ähnliche Datenpräsentation von PCA-Score Plots wurde zuvor von Eijkel *et al.* und Amstalden van Hove *et al.* gezeigt. [171, 172, 274] In Bezug auf den Imaging-Datensatz der Pollenproben sind so die Loadings der ersten drei PC in Abbildung 5-33 D aufgetragen und in Abbildung 5-33 E werden die entsprechenden positiven und negativen Plots der jeweiligen Scores angezeigt. Zudem wurden innerhalb der Loadings (Abb. 5-33 D) der prozentuale Anteil an der Gesamtvarianz angegeben, der von der jeweilige PC abgebildet wird.

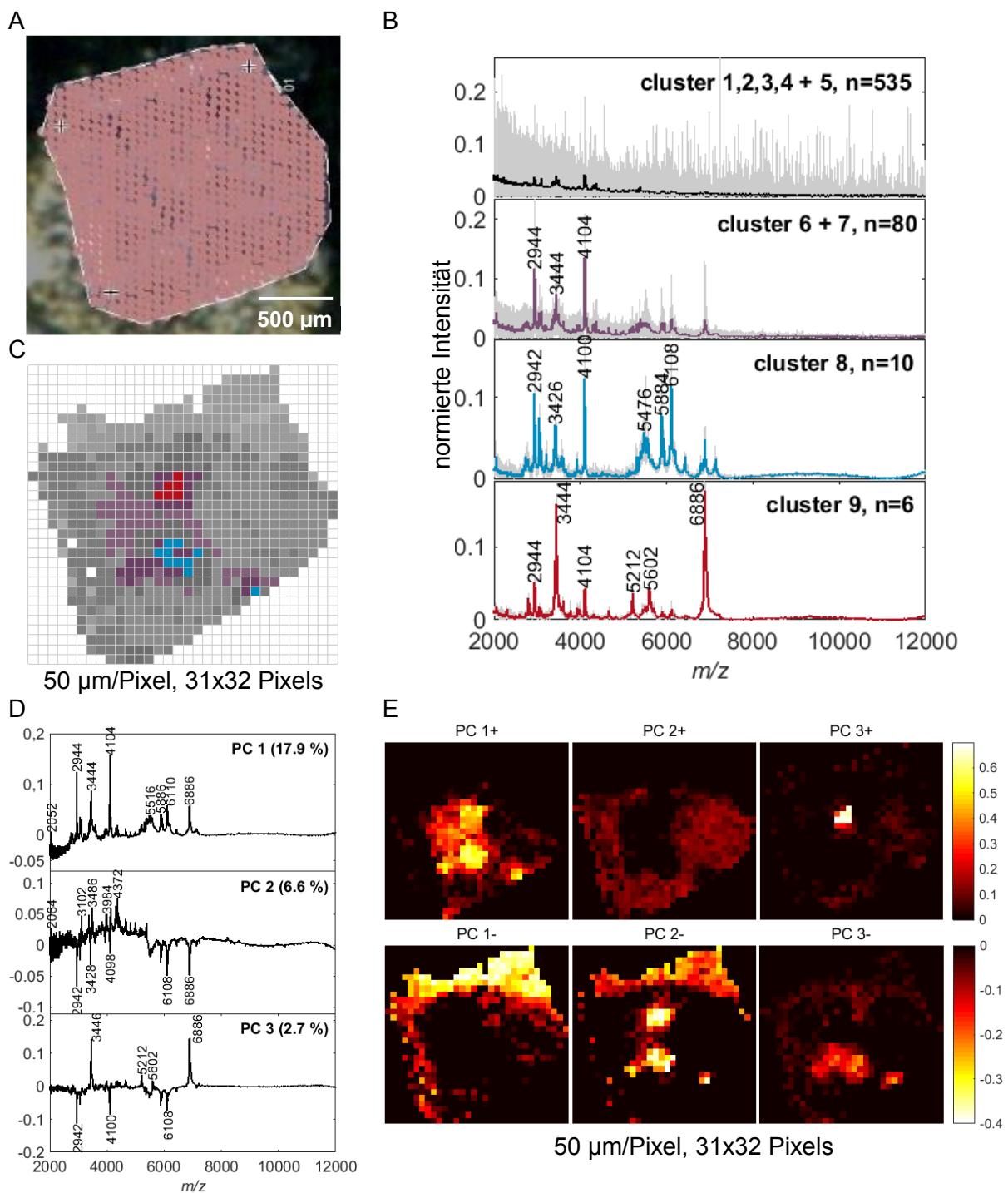


Abbildung 5-33: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus jeweils *fünf* Pollenkörnern der drei Arten, Laserpunkt Abstand 50 µm. (B) Mittelwerts-Spektren der durch HCA bestimmten Cluster, wobei n die Anzahl der in einem Cluster gemittelten Spektren angibt. (C) HCA-Bild mit unterschiedlichen Farben für jedes Cluster. (D) PCA-Loadings der ersten drei PCs. (E) Positive und negative Bilder der PCA-Scores.

Die PCA enthält im Loading-Vektor (Abb. 5-33 D) von PC 1 (negative Werte) und PC 2 (positive Werte bis  $m/z$  5000) Peakmuster, die hauptsächlich aus Signalen geringer Intensität bestehen. Im Gegensatz dazu zeigen die positiven und negativen Loading-

Signale der PC 3 artspezifische Signale. Hier konnten positive Loadings, wie z.B. Peaks bei  $m/z$  3446, 5212 und 6886 der *A. cordata*-Probe zugeordnet werden, während die negativen Loadings bei  $m/z$  2942, 4100 und 6108 für *C. avellana*-Spektren spezifisch sind. So zeigen die Scores der PC 3 (Abb. 5-33 E, PC 3) positive und negative Werte in zwei abgetrennten Bereichen, in denen entsprechend entweder *A. cordata*- oder *C. avellana*-Pollenkörner auftraten.

Ein Vergleich dieses Scores-Plots (Abb. 5-33 E, PC 3) mit der HCA-Abbildung (Abb. 5-33 C) zeigt die jeweiligen Pollenkörner an ähnlichen Positionen an. Eine Trennung von *C. avellana*- und *A. cordata*-Pollenspektren durch Imaging konnte demnach sowohl durch HCA als auch durch PCA erreicht werden. Die Identifizierung von *P. sylvestris*-Pollenkörnern in dieser Mischung war jedoch weder mit HCA noch mit PCA möglich.

Ein zweiter Versuch mit der höheren Auflösung wurde auf einem weiteren ProbenSpot mit einer Mischung von jeweils 3 Pollenkörnern (siehe Abb. 5-34 A) durchgeführt. Insgesamt wurden 11 Cluster auf der Grundlage der HCA (Abb. 5-34 B, C) ausgewählt, um die Analytspektren von den Hintergrundspektren zu unterscheiden. Im ersten Spektrum von Abbildung 5-34 B wurden 829 Hintergrundspektren zusammengefasst (Cluster 1, 2, 5, 6, 8, 10 und 11). Im zweiten Teil von Abbildung 5-34 B wurden Spektren mit spezifischen *C. avellana*-Peaks bei  $m/z$  2946, 4106 und 6116 kombiniert (Cluster 3 und 4), während der dritte Plot Spektren mit Peak-Charakteristiken von *A. cordata*-Pollenkörnern bei  $m/z$  von 3444, 5210 und 6886 (Cluster 7 und 9) enthielt. Abbildung 5-34 C veranschaulicht das rekonstruierte HCA-Image basierend auf der Position und HCA-Clusterklasse der Spektren. Überraschenderweise sind vier Regionen sichtbar, die auf das Vorkommen von *C. avellana*-Pollenkörnern (blau) hinweisen, obwohl nur drei Pollenkörner verwendet wurden. Dieses zusätzliche Signal kann entweder durch eine Trennung der Extrakte eines Pollenkorns oder durch versehentliche Ablagerung eines zusätzlichen Pollenkorns während der Probenvorbereitung entstanden sein. Der optische Nachweis der Anzahl der präparierten Pollenkörner über das Auflichtmikroskop und deren korrekte Bestimmung wurde aufgrund der starken Reflexionen des Klebebandes erschwert.

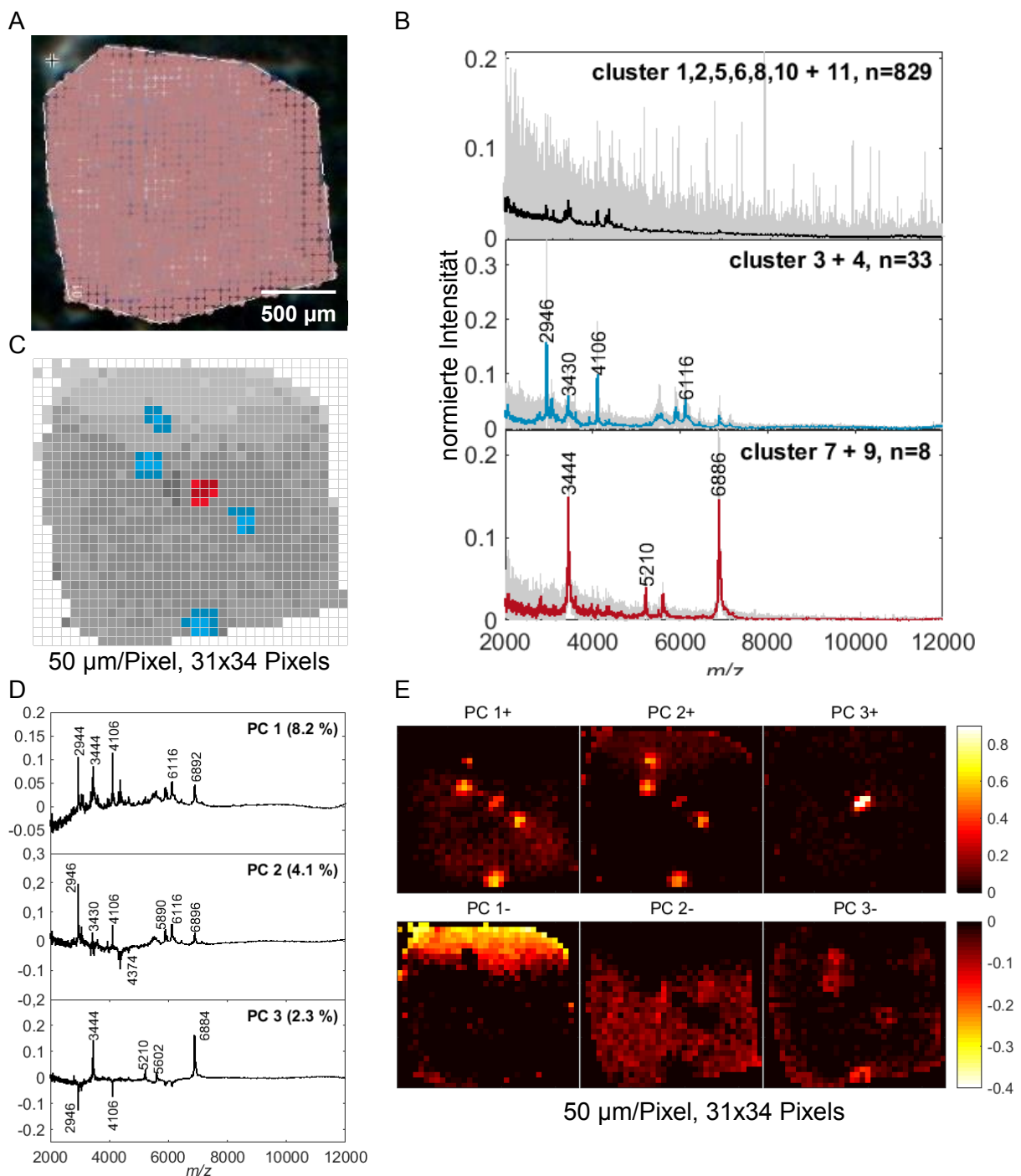


Abbildung 5-34: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus jeweils *drei* Pollenkörnern der drei Arten, Laserpunktstand 50 µm. (B) Mittelwerts-Spektren der durch HCA bestimmten Cluster, wobei n die Anzahl der in einem Cluster gemittelten Spektren angibt. (C) HCA-Bild mit unterschiedlichen Farben für jedes Cluster. (D) PCA-Loadings der ersten drei PCs. (E) Positive und negative Bilder der PCA-Scores.

Abbildung 5-34 D, E stellt eine PCA, die am selben Datensatz berechnet wurde, dar. Der Loading-Vektor der PC 1 (Abb. 5-34 D, erster Plot) bildet die Hauptvarianz im Datensatz ab, wobei die negativen Werte hauptsächlich Signale in niedriger Intensität enthalten und die positiven Loading-Werte verschiedene Peakmuster kombinieren. Deren

Unterscheidung wird durch die Loading-Vektoren von PC 2 und PC 3 ermöglicht. Der positive Bereich im Loading von PC 2 (Abb. 5-34 D, zweiter Plot) ähnelt weitestgehend dem positiven Bereich im Loading von PC 1. Die Ausnahme bildet das Peakmuster um  $m/z$  4734, welches hier im negativen Bereich des Vektors zu finden ist. Eine weitere Differenzierung wird durch den Loading-Vektor der dritten Hauptkomponente (PC 3) deutlich. Der Loading-Vektor von PC 3 (Abb. 5-34 D, dritter Plot) zeigt den zuvor beschriebenen Unterschied zwischen spezifischen Peaks für *A. cordata* bei  $m/z$  3444, 5210 und 6884 und *C. avellana*-Peaks bei  $m/z$  2946 und 4106. Die entsprechenden, in Abbildung 5-34 E dargestellten Scores-Werte der PC 3, zeigen die lokale Position der *A. cordata*-(PC 3+) bzw. *C. avellana*-(PC 3-) Pollenkörner an. Diese Bereiche befinden sich an den gleichen Stellen des Probenpunktes, wie die entsprechenden Zuordnungen im HCA-Image (Abb. 5-34 C).

Abschließend wurde das Potential des MALDI-TOF MSI-Verfahrens bei 50  $\mu\text{m}$  Auflösung mit einer 3er Mischung von je 1 Pollenkorn (siehe Abb. 5-35) getestet. Hier wurden 622 Spektren (A) gemessen und durch HCA in fünf Cluster sortiert (B und C). Die 602 Spektren aus Cluster 1, 2 und 3 wurden als Hintergrundspektren in einem Plot gebündelt (Abb. 5-35 B, schwarz), während die anderen 20 Spektren aus Cluster 4 und 5 (blau und rot) Peakmuster zeigten, die den Pollenreferenzspektren zugeordnet werden konnten. Das Mittelwertspektrum des Clusters 4 (blau) enthält vor allem *C. avellana*-spezifische Peaks ( $m/z$  2944, 4104 und 6114), während Cluster 5 (rot) Spektren mit *A. cordata*-spezifischen Peaks ( $m/z$  3448, 6888) zeigt. Im entsprechenden HCA-Bild in Abbildung 5-35 C befindet sich das *C. avellana*-Pollenkorn (blau) direkt neben dem *A. cordata*-Pollenkorn (rot). Außerdem wurde ein zweites *A. cordata*-Pollenkorn am oberen Rand der Probe gefunden. Diese Daten zeigen, dass die Extraktion der Analyten eines einzelnen Pollenkorns im Bereich von 100-150  $\mu\text{m}$  liegt, obwohl die Korngröße (Tab. 5-5) geringer ist.

Die PCA des Imaging-Datensatzes mit je einem Pollenkorn wird in Abbildung 5-35 D mit den Loadings der ersten drei PC und Abbildung 5-35 E mit den entsprechenden Abbildungen der PCA-Scores dargestellt. Hier befinden sich die entscheidenden Werte vor allem im Loading von PC 3 (Abb. 5-35 D), wo sich die für *C. avellana*-Spektren spezifischen Peaks als positive Loading-Signale und die für *A. cordata*-Spektren spezifischen Peaks als negative Loading-Signale unterscheiden lassen. Die Position der beiden Pollenkornarten auf dem Probenpunkt, die durch die Scores-Images von PC 3+ und - (Abb. 5-35 E) gegeben ist, entspricht nahezu dem HCA-Bild (Abb. 5-35 C). Spezifische Bereiche, die eindeutig *P. sylvestris* zugeordnet werden können, wurden wiederum nicht gefunden.

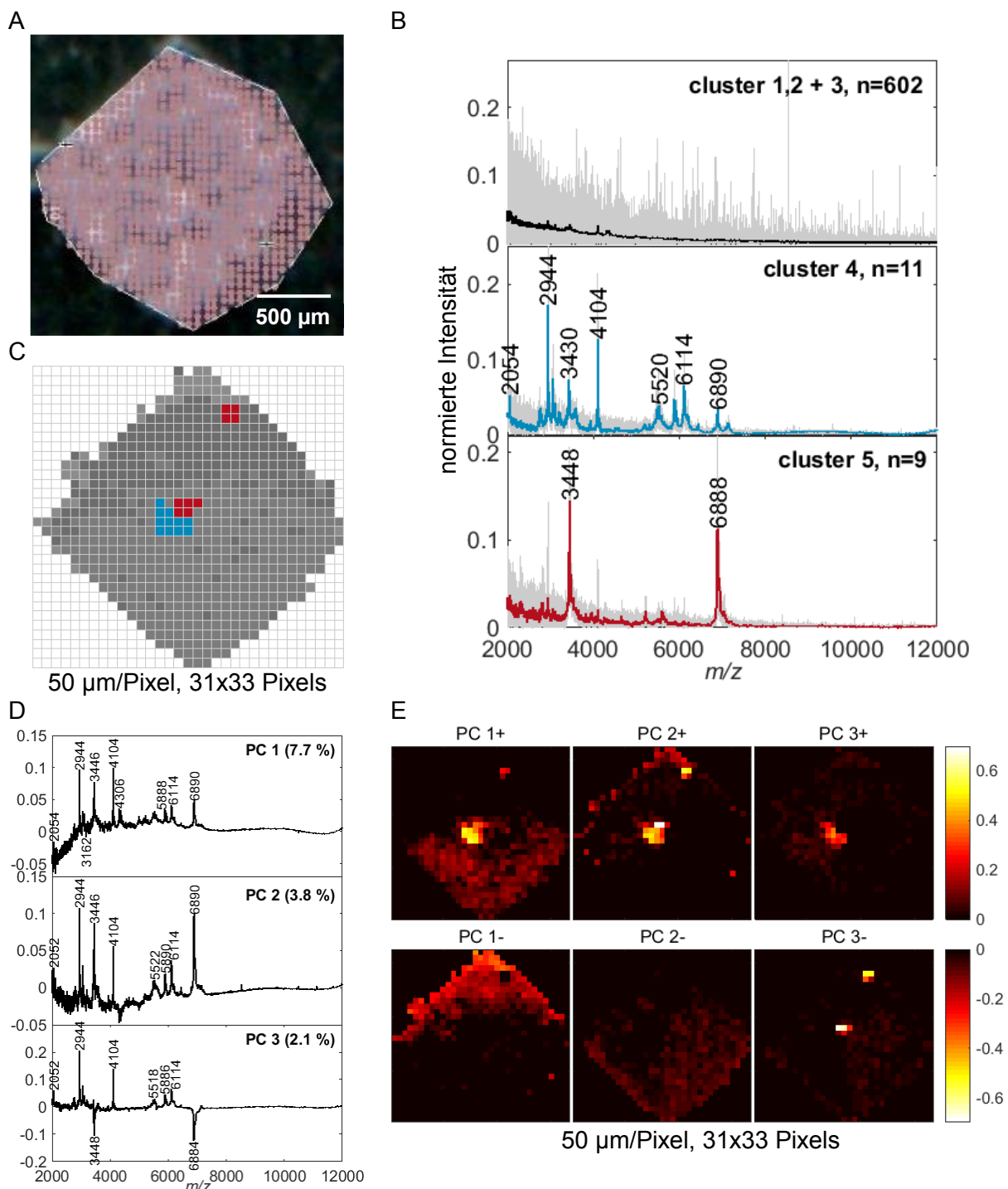


Abbildung 5-35: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus jeweils *einem* Pollenkorn der drei Arten, Laserpunktstand 50 µm. (B) Mittelwertspektren der durch HCA bestimmten Cluster, wobei n die Anzahl der in einem Cluster gemittelten Spektren angibt. (C) HCA-Bild mit unterschiedlichen Farben für jedes Cluster. (D) PCA-Loadings der ersten drei PCs. (E) Positive und negative Bilder der PCA-Scores.

Die Größenbestimmung der eingesetzten Pollenkörner über eine statistische Auswertung von Mikroskopaufnahmen ergab im Mittel von jeweils 10 Pollenkörnern eine Größe von 30,9 µm für die dreieckigen *C. avellana*-Pollenkörner, von 25,2 µm für die fünfeckigen *A. cordata*-Pollenkörner und von 52,2 µm für die *P. sylvestris*-Pollenkörner (Tab. 5-5). Die höhere

Standardabweichung der *P. sylvestris*-Pollenkörner kann durch deren Form mit luftgefüllten Blasen (lat. *sacci*) erklärt werden.

Tabelle 5-5: Statistische Auswertung der Größe von je 10 Pollenkörnern durch Mikroskopaufnahmen mit einer Olympus UC 90 Mikroskop-Kamera bei 20-facher Vergrößerung.

Name	<i>C. avellana</i>	<i>A. cordata</i>	<i>P. sylvestris</i>
Anzahl	10	10	10
Minimum [µm]	29,57	24,15	49,28
Maximum [µm]	32,52	28,35	57,41
Mittelwert [µm]	30,87	25,22	53,22
Std. Abweichung [µm]	0,79	1,20	2,45

### 5.3.3 Identifizierung von Pollenkörnern in Mischungen anhand unabhängiger Referenzproben

In diesem Teil wird eine zusätzliche Methode zur Identifizierung der Imaging-Spektren vorgestellt. Dazu wurden 270 unabhängige Referenzspektren derselben Spezies nach identischer Pollenprobenpräparation aufgenommen. Dies erfolgte allerdings mit einer unterschiedlichen Anzahl von Pollenkörnern und zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zur Auswertung wurde im ersten Schritt eine PCA (Abbildung 5-36 A, B) an diesen Daten durchgeführt. Die Loadings (Abb. 5-36 A) und der Scores-Plot von PC 1 und PC 2 (Abb. 5-36 B) zeigen eine Trennung aller drei Spezies. *C. avellana*-typische Masseninformationen wurden hier durch die blau markierten Bereiche der Loadings (Abb. 5-36 A) und durch negative Scores-Werte in PC 1 und PC 2 (Abb. 5-36 B) dargestellt. *A. cordata*-spezifische spektrometrische Informationen wurden in den rot markierten Bereichen der Loading-Vektoren und durch positive Score-Werte in PC 1 und negative Werte in PC 2 gefunden. Charakteristische *P. sylvestris*-Peaks sind in PC 1 nicht zu finden, waren aber als positive Score-Werte im PC 2 vorhanden (Abb. 5-36 A, B).

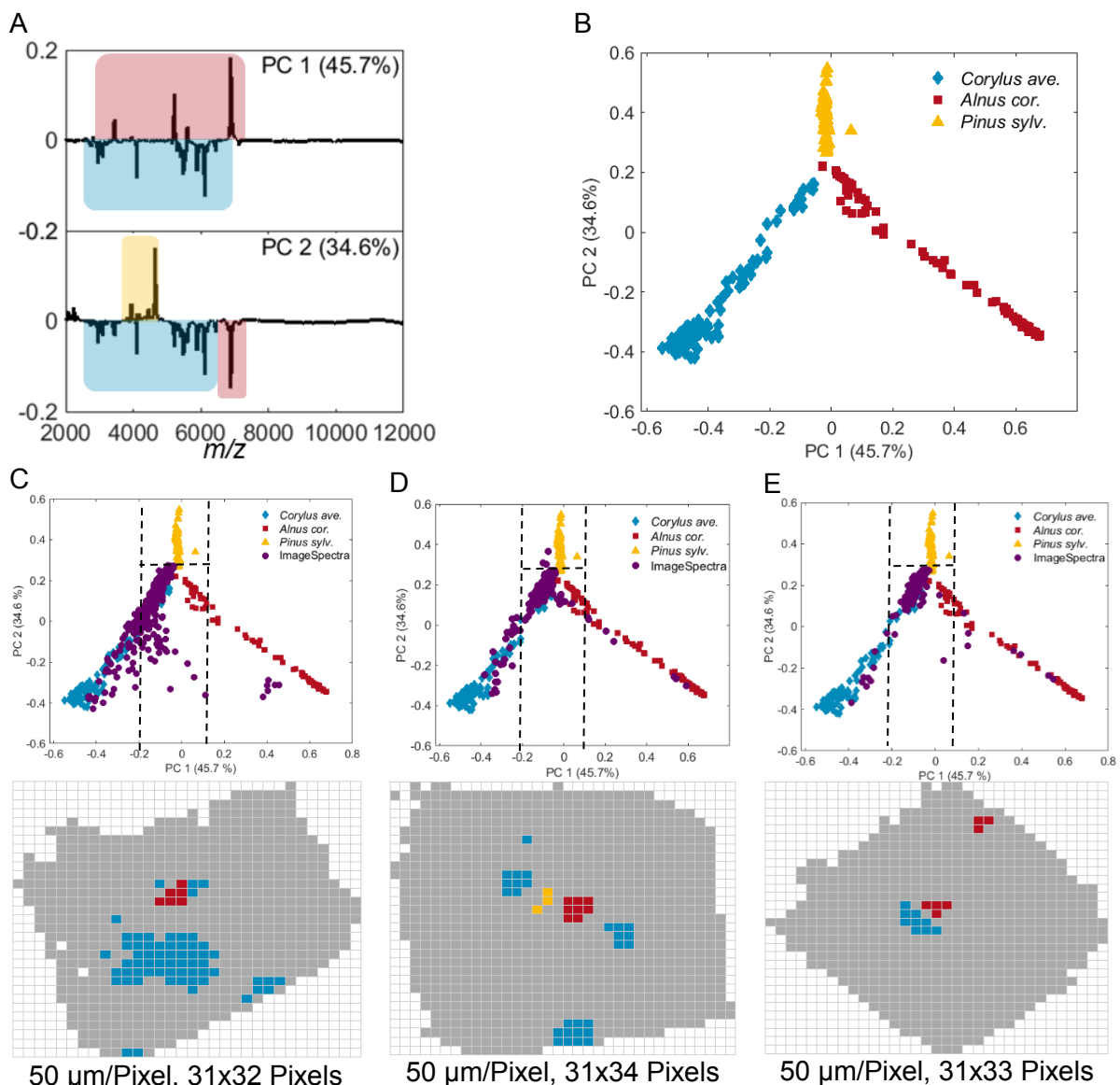


Abbildung 5-36: (A/B) PCA von unabhängigen Referenzspektren aller Proben, die als (A) Loadings und (B) Scores-Werte für die ersten und zweiten PCs dargestellt werden. (C-F) Projektion der Imaging-Spektren in den gegebenen PCA-Raum: (C) enthält den Datensatz aus Abb. 5-33 mit 631 Spektren bei Mischung aus fünf Pollenkörnern jeder Art (D) zeigt die 870 Spektren der entsprechenden Mischung aus drei Pollenkörnern aus Abb. 5-34 und (E) die 622 Spektren aus Abb. 5-35 bei je einem Pollenkorn.

Basierend auf dieser Differenzierung und ähnlich wie bei Jansen *et al.* (POCHEMON) wurden die 631, 870 oder 622 Spektren aus den zuvor gezeigten Imaging-Datensätzen (Abb. 5-33,-34 und -35) in die Referenz-PCA projiziert (Abb. 5-36 C-E, oben, violette Punkte). [320] Anschließend wurden für jede Spezies konstante Grenzwerte (gestrichelte Linien) festgelegt. Der blaue Bereich (*C. avellana*) wurde durch Scores-Werte bis - 0,2 für PC 1 begrenzt, der rote Bereich (*A. cordata*) begann bei Scores-Werten über 0,1 für PC 1 und der gelbe Bereich (*P. sylvestris*) wurde durch Scores-Werte über 0,3 für PC 2 eingegrenzt. Danach wurde diese Schwellwertinformation jedes



Spektrums auf die Position des Spektrums übertragen und in dem bekannten Bildformat dargestellt (Abb. 5-36 C-E, unten).

Diese unabhängige Zuordnung der in Abbildung 5-36 C-E dargestellten PCA-Projektionen unterstützt die über HCA und PCA erzielten Ergebnisse vollständig. Die einzelnen Pollenkorn-Informationen können an identischen Stellen auf den jeweiligen Probenpunkten beobachtet werden. Zusätzlich konnten im Datensatz der Pollenmischung mit je drei Pollenkörner (Abb. 5-34) zu *P. sylvestris* gehörende Spektren identifiziert werden (Abb. 5-36 D, gelbe Pixel).

#### 5.3.4 Fazit

Die Empfindlichkeit der MALDI-TOF Massenspektrometrie ist ausreichend für die Analyse einzelner Pollenkörner verschiedener Spezies. Darüber hinaus hat sich das Imaging von Pollenmischungen als geeigneter Ansatz erwiesen, um einzelne Pollenkörner in Mischungen zu erkennen und zu identifizieren. Es zeigt sich, dass eine höhere räumliche Auflösung, d.h. kleinere Pixelgröße zu einer besseren Abdeckung des ausgewählten Bildbereichs führt, was zu einer insgesamt höheren Empfindlichkeit führt. Da die Imaging-Spektren komplexe Informationen enthalten, ist eine multivariate Auswertung für eine erfolgreiche Trennung und Identifizierung unerlässlich. Mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse (HCA) können Spektren anhand der gesamten spektrometrischen Variationen in Cluster unterteilt werden. Der visuelle Vergleich der Cluster-Spektren mit separat gemessenen Pollenspektren liefert erste Details zu der Art des Pollenkorns. Die Lokalisierung der Pollenkörner wird durch die Kombination der Clusterinformationen mit der räumlichen Position des jeweiligen Spektrums erreicht. Die Durchführung der PCA unterstützt und bestätigt diese Zuordnungen. Die Klassifizierung der aufgenommenen Imaging-Spektren in Bezug auf Referenzspektren in einem varianzgewichteten PCA-Raum ermöglicht zudem eine unabhängige Identifizierung der Pollenkörner in den Gemischen.

### 5.4 DART-Messungen von einzelnen Pollenproben

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt, ist MALDI-TOF MSI zum Nachweis und zur Identifizierung unterschiedlicher Spezies in Pollenkornmischungen geeignet. Die dazu notwendigen Präparationsschritte wie Fixierung, Extraktion und Matrixauftragung konnten wesentlich vereinfacht werden, stellen aber zusammen mit den apparativen Voraussetzungen wie dem Einschleusen ins Hochvakuum noch recht aufwändige Schritte

dar. Deshalb war es interessant zu untersuchen, ob sich Pollenkörner mit alternativen MS Methoden, z.B. unter Atmosphärendruck, untersuchen lassen. Eine Technik zur direkten massenspektrometrischen Analyse der Pollenkörner unter Umgebungsbedingungen ohne extensive Probenvorbereitung stellt die Direct Analysis in Real Time (DART) dar. Auf Grund der speziellen Art der Ionisation können lediglich niedermolekulare Ionen bis ca.  $m/z$  2500 erzeugt und gemessen werden. Von besonderem Interesse war daher die Frage, inwieweit diese Informationen komplementär zu den MALDI-Ergebnissen sind.

Die Untersuchungen von drei Pollenproben wurden im MS-Labor des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg an einem ApexQe bei 200°C im Positiv-Ionenmodus durchgeführt. Bei den Pollenproben handelte es sich um *Artemisia absinthum* (Wermutkraut) (Sigma Aldrich) und gesammelte *Betula ermanii* (Gold-Birke) und *Pinus rigida* (Pech-Kiefer) Pollenkörner.

In Analogie zum BioTyper-Ansatz im MALDI-TOF MS, der eine Fixierung der Probe erfordert, wurden die Pollenkörner für die DART-Messungen fixiert. Für die Untersuchungen wurden 3 verschiedene Präparationen verwendet.

1. Die Pollenkörner wurden auf einer dünnen, ca. 200 nm Harzschicht abgesetzt, welche zuvor auf dem Probenträger unter Verwendung eines kleinen Pinsels in Lösung aufgebracht wurde.
2. Zusätzlich zu Schritt 1 wurde 1  $\mu$ l Isopropylalkohol (IPA) auf den Spot gegeben, welches das zuvor aufgetragene Harz aufweichen und damit eine bessere Fixierung der Pollenkörner ermöglichen sollte.
3. Zusätzlich zu Schritt 1 wurden ein Gemisch aus jeweils 0.5  $\mu$ l IPA und TFA aufgetragen, um einen möglichen Effekt der Säureextraktion (TFA) zu untersuchen.

#### 5.4.1 Spektrale Vorbehandlung der DART-Spektren

Die erhaltenen DART-Pollenspektren stellten die bisher verwendete Auswertung vor neue Herausforderungen. Die bisher gemessenen MALDI-Spektren enthielten ~24000 Datenpunkte pro Spektrum, Aufgrund der hochaufgelösten Messungen bestand jedes DART-Spektrum jedoch aus knapp zwei Millionen Datenpunkte, die für eine multivariate Auswertung zwingend reduziert werden mussten. Dazu zeigte der genaue Blick in den Datensatz, dass die x-Werte ( $m/z$ ) scheinbar nicht äquidistant waren, sondern wegen Rundungsfehlern ‚Doppelgänger‘ (17444 Zeilen) enthielten, die zunächst in jedem Spektrum entfernt werden mussten. Ähnlich zu der Auswertung der MALDI-Spektren bestand der erste Ansatz darin, die Datenpunkte in den Spektren über eine Interpolation weiter zu reduzieren. Dazu wurde ein Spektrum in einem Bereich von  $m/z$  173.4 bis 2499 über jeden 0.005 Datenpunkt mit 4 verschiedenen Funktionen (`pchip`, `spline`, `msresample`, `interp1`)

interpoliert. Dies entspricht einer Reduktion der Datenpunkte von 76 Prozent bei vorher 1.934.441 zu nachher 465.121 Variablen.

Die folgende Abbildung 5-37 stellt die Ergebnisse der Interpolationsberechnungen dieser vier Funktionen für das Spektrum der *A. absinthum*-Pollenprobe dar. Jeweils in rot ist das Originalspektrum zu sehen, während im Gegensatz dazu die interpolierten Spektren in schwarz hinzugefügt wurden. Bei der paarweisen Interpolation (A, Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial), Spline-Interpolation (B, Cubic spline data interpolation) und 1-D Dateninterpolation (D) sind deutliche Informationsverluste im niedrigen Massenbereich und bleibende Rauschsignale im hohen Massenbereich zu sehen. Im Gegensatz dazu reduziert die `msresample`-Funktion (C) zwar die irrelevanten Signale im hohen Massenbereich, zeigt jedoch deutlich geringere Intensitäten in den Peak-Bereichen. Da die DART-,Peaks‘ sehr schmal sind, kann keine dieser Funktionen das Spektrum ohne Verlust von Peak-Signalen für eine multivariate Analyse vereinfachen.

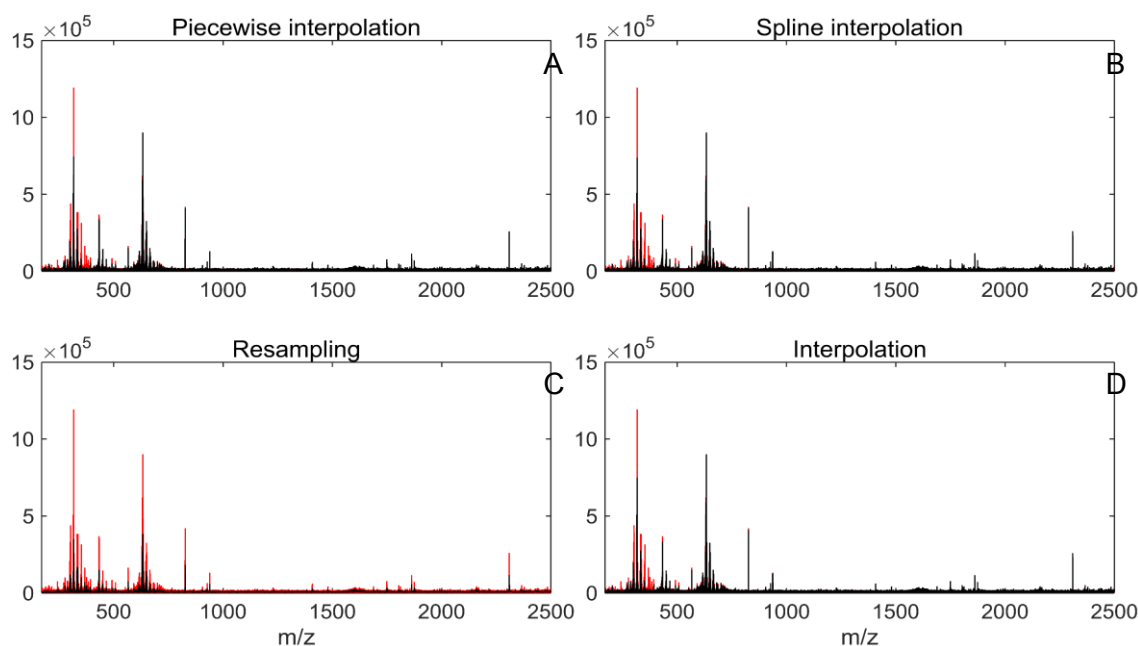


Abbildung 5-37: Jeweils in rot ist das Original-DART-Spektrum einer *A. absinthum* Pollenprobe zu sehen und dazu in schwarz die `pchip`-Interpolation (A), `spline`-Interpolation (B), das Resampling (C) und die 1-D Dateninterpolation (D) dieses Spektrums.

Deswegen musste ein neuer Ansatz entwickelt werden, der den Informationsgehalt der Spektren erhält und dabei trotzdem die Datenpunkte im Spektrum, die keine Peaks darstellen, eliminiert. Die Lösung bestand darin über eine Peak-Selektion einen Vektor zu erstellen, mit dem die Spektren anschließend interpoliert werden konnten. Dazu wurde die bereits beschriebene `findpeaks`-Funktion ('MinPeakHeight', 24000) iterativ auf alle Spektren angewendet, was zu einem Vektor mit 15279 Datenpunkten von  $m/z$  173,28 bis 2499,96 führte. Nach Eliminierung der ‚Doppelgänger‘ enthielt dieser Vektor schließlich 8242

Datenpunkte. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 5-38 dargestellt. Die Auswahl der Peaks über die `findpeaks`-Funktion (blaue Dreiecke) ist wiederum am zuvor verwendeten Spektrum der *A. absinthum*-Pollenprobe gezeigt (A) und die nachfolgende 1-D Dateninterpolation über den neu berechneten Peak-Picking-Vektor ist in (B) zu sehen.

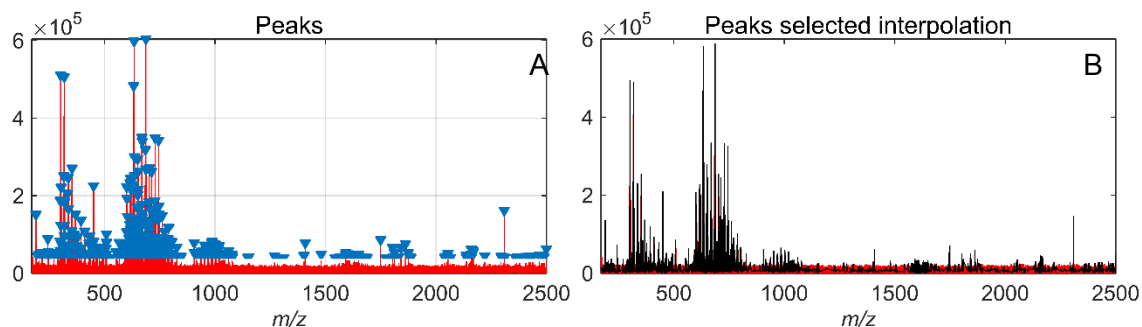


Abbildung 5-38: (A) zeigt die mit blauen Dreiecken markierten Peaks des Original-Spektrums berechnet über die `findpeaks`-Funktion, in (schwarz B) ist die neue Interpolation des entsprechenden *A. absinthum*-Pollenspektrums über den neu erzeugten Peak-Picking-Vektor gezeigt, während rot unterlegt das Original-Spektrum eingezeichnet ist.

Der Anwendung dieser Kombination reduzierte die Datenpunkte ohne Informationsverlust im Peak-relevanten Bereich in jedem Spektrum um 99,57 Prozent. Dabei war es nicht entscheidend, ob ein Spektrum in allen ausgewählten Bereich über Peak-Informationen verfügte.

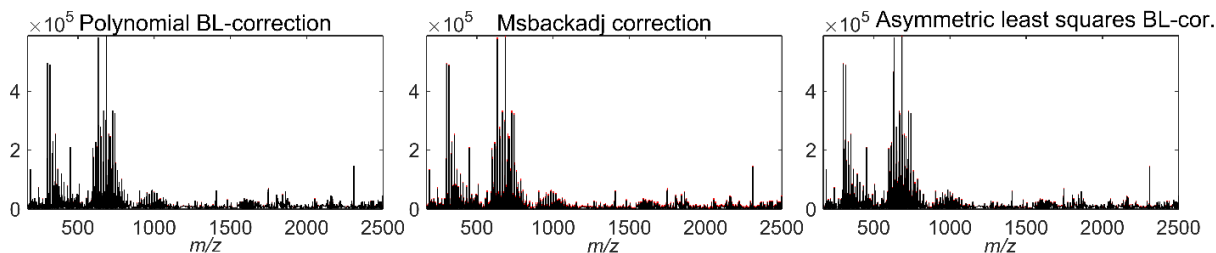


Abbildung 5-39: In schwarz gezeigt sind drei mögliche Optionen zur Basislinienkorrektur des *A. absinthum*-Pollenspektrums, während rot hinterlegt das interpolierten Original-Spektrum zu sehen ist.

Eine weitere Abbildung 5-39 verdeutlicht, dass jegliche zusätzliche Basislinienkorrektur wie polynomielle Basislinienkorrektur, MSbackadj-Korrektur oder asLS-Basislinienkorrektur des interpolierten DART-Spektrums keine Unterschiede hervorrief. Dementsprechend konnte am reduzierten Datensatz eine multivariate Analyse durchgeführt werden.

## 5.4.2 Hauptkomponentenanalyse der DART-Spektren

In Abbildung 5-40 ist die PCA der 19 DART-Spektren gezeigt. Die Kombination der Scores-Plots der ersten drei PC sind in A (PC 1 vs. PC 2), B (PC 1 vs. PC 3) und C (PC 2 vs. PC 3) gezeigt. Die Annotation der Spektren in den Scores-Plots erfolgte dabei in Abhängigkeit von der beschriebenen Probenpräparation, genauer Schritt 1. ohne Bezeichnung, 2. = IPA und 3. = TFA. Darüber hinaus sind in den Scores-Plots zwei Harzspektren ohne Pollen (violette Kreise) eingetragen. Die drei Loadings der PCs mit den Hinweisen zur Herkunft der Varianzen sind in D abgebildet (Abb. 5-40).

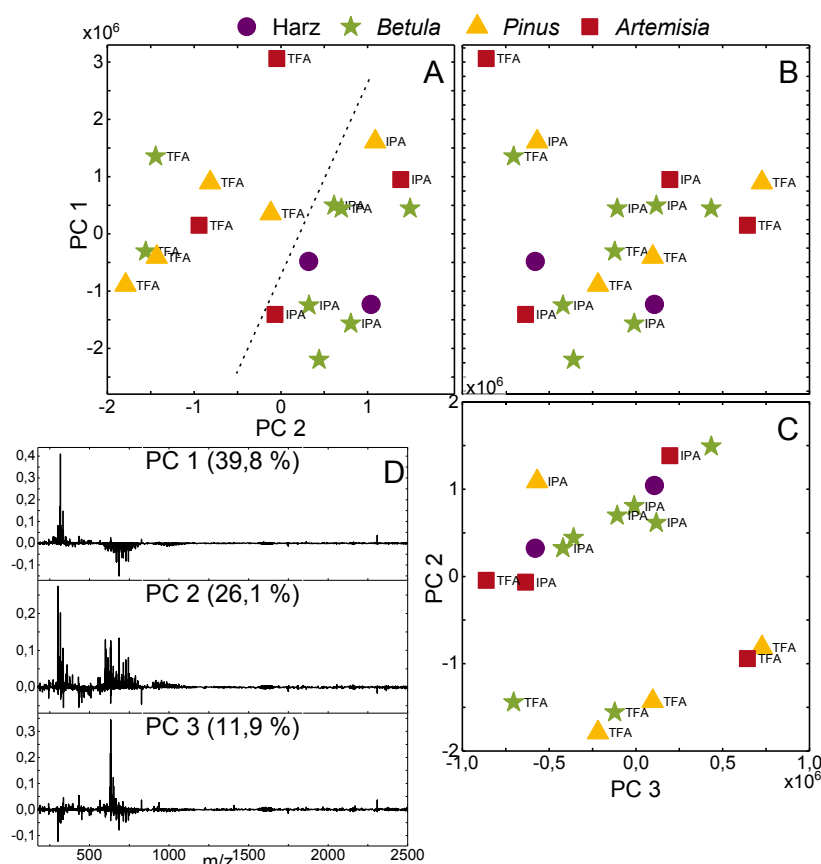


Abbildung 5-40: PCA der 19 DART-Spektren mit den Scores-Plots für (A) PC 1 vs. PC 2, (B) PC 1 vs. PC 3 (B) und (C) PC 2 vs. PC 3 und (D) den entsprechenden Loadings der ersten drei PCs.

Die auffälligste Varianz (Abb. 5-40 A) zwischen den Spektren, verdeutlicht durch die gestrichelte Linie, zeigt sich in den Scores zwischen zwei gewählten Präparationsmethoden (2 – IPA im Bereich PC 2+ vs. 3 – TFA im Bereich PC 2-). Hier enthalten die negativen Loading-Signale der PC 2 Peak-Informationen, die offensichtlich erst nach der Säureextraktion hinzugekommen sind (Abb. 5-40 D, zweiter Plot). Im Gegensatz dazu ist in den Scores-Plots (A-C) im Hinblick auf die drei Pflanzenarten jedoch kein klarer Trend zu erkennen.

Möglicherweise kann eine separate PCA der Spektren der zwei Präparationsarten, mit IPA /2. oder TFA/3. eindeutigere Ergebnisse liefern. Eine andere Option, die für eine bessere Auftrennung der Spektren in der PCA hilfreich sein könnte, stellt die Subtraktion der Harz-Spektren von den anderen 17 Probenspektren dar. Dazu wurden die 17 Pollenspektren mit dem Harz-Mittelwerts-Spektrum subtrahiert und alle negativen Werte nachfolgend durch 0 ersetzt. Die 17 Neuberechneten Pollenspektren enthalten demnach nur Peaks, die im Harzspektrum nicht präsent waren. Beide Ansätze zur Modifikation der Daten wurden im Folgenden untersucht.

Beispielhaft sind in Abbildung 5-41 A-D die separate PCA der Messspektren nach zusätzlicher Säurebehandlung (TFA/3.) und die PCA (E-H) der Messspektren, die nach Subtraktion der Harzsignale erhalten wurden, zu sehen. In der PCA der 8 TFA-Spektren (A-D) lassen sich vorrangig die Scores der *B. ermanii*-Spektren im Bereich von PC 2- und PC 3+ von denen der *P. rigida*-Spektren im Bereich von PC 2+ und PC 3- trennen. Darüber hinaus fällt ein *A. absinthum*-Spektrum in PC 1+ und PC 3- mit einem deutlichen Peakmuster (Abb. 5-41 D) um  $m/z$  317,2108 (mögliche Formel  $C_{20}H_{29}O_3$ ) auf.

Im Vergleich dazu ist es durch eine PCA der Harzhintergrund subtrahierten Spektren (E-H) nahezu unmöglich, eine klare Separation der Spektren zu erreichen und einen Trend hinsichtlich der Arten auszumachen. Eher können hier noch Aussagen zu einzelnen Spektren getroffen werden wie z.B. Spektrum von *Artemisia*/TFA mit stark positivem Score in PC 1; Spektrum von *Betula*/TFA mit stark positivem PC 2-Score oder Spektrum von *Pinus*/TFA mit stark positivem Score für PC 3.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen somit, dass trotz diese beiden Modifikationen der Datenanalyse wieder keine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Arten möglich ist.

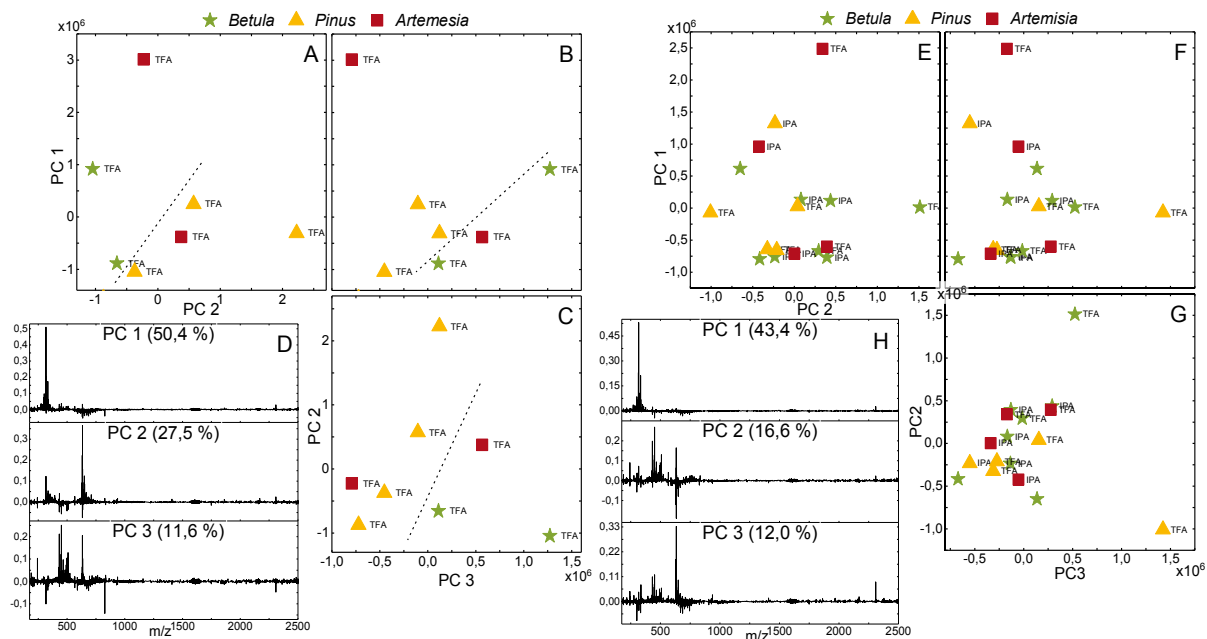


Abbildung 5-41: (A-D) Selektive PCA von 8 DART-Spektren im dritten Präparationsschritt, d.h. mit TFA gemessen, mit den entsprechenden (A-C) Scores und (D) Loadings und (E-H) eine weitere PCA an 17 Harz-Hintergrund subtrahierten Spektren mit den entsprechenden (E-G) Scores und (H) Loadings.

### 5.4.3 Fazit

Im Gegensatz zu den in der Kapitel 2.1 (Typisierung von biologischen Proben – Massenspektrometrie) zitierten Veröffentlichungen, die das Potential von DART zur Typisierung belegten, gelang dies bei den drei vorgestellten Pollenproben nicht. Die im Fall der MALDI-Spektren verwendeten mathematischen Verfahren zur Datenreduktion lieferten bei den DART-Messungen nur ungenügende Ergebnisse, sodass für die Spektrenaufbereitung neue Ansätze wie die 1-D Interpolation mittels Peak-Picking-Vektor angewendet werden mussten. Die sodann erfolgreiche chemometrische Datenreduktion der DART-Pollenspektren führte jedoch nicht zu einer eindeutigen Klassifizierung hinsichtlich der entsprechenden Pflanzenart. Ein hilfreicher Aspekt, der jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit war, könnte die entsprechende Optimierung der Probenvorbereitung von Pollenkörnern für die DART Analyse sein.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, eine alternative massenspektrometrische Methode zu entwickeln, die eine schnelle und sichere Bestimmung von Pollenkörnern ermöglicht. Der Fokus lag dabei einerseits auf der Optimierung der chemischen Probenvorbehandlung und den instrumentellen Einstellungen des MALDI-TOF Massenspektrometers und andererseits der Auswahl und Anpassung geeigneter multivariater Verfahren.

Bei der Optimierung der instrumentellen Einstellungen wurden die Art und Weise der Aufnahme und der Akkumulation von Einzelspektren untersucht. In diesem Zusammenhang kam Parametern wie Laserprofil, Laserintensität und Ionen-Suppression eine entscheidende Bedeutung zu.

Bei der Probenvorbereitung wurde der Schwerpunkt auf die Fixierung der Pollenkörner, deren Extraktion und die darauffolgende Matrixauftragung gelegt. So zeigte sich, dass eine Fixierung mit doppelseitigem, leitfähigem Klebeband hilfreich war. Die Verwendung eines solchen Klebebandes ist darüber hinaus für die Extraktion vorteilhaft, da die extrahierten Analyten offensichtlich näher am Pollenkorn gehalten werden und somit eine höhere Analytkonzentration und damit intensivere Signale ermöglicht wird. Diese erhöhte Empfindlichkeit war wichtig für den Nachweis einzelner Pollenkörner. Einen weiteren wichtigen Prozess stellte die Extraktion der Analyten aus dem Pollenkorn dar. Es konnte klar gezeigt werden, dass die Verwendung einer Säure für eine ausreichende Extraktion unerlässlich ist. Dieser Schritt konnte durch die Zugabe der Säure zum Matrixlösungsmittel stark vereinfacht werden, sodass ein zusätzlicher, separater Extraktionsschritt nicht mehr erforderlich war.

Durch die Anwendung eines simulierten Mischungsdreiecks konnten eindeutig Peaksuppressionseffekte in Mischungen von Pollenkörnern dreier Pflanzenarten nachgewiesen werden, die die Detektion einzelner Spezies erschwerte. Hier bietet die Verwendung der MALDI-TOF Imaging Massenspektrometrie in Kombination mit dem verwendeten Klebeband einen Ausweg, da hierbei einzelne Pollenkörner lokal getrennt voneinander fixiert werden und sich deren Extrakte nicht oder nur gering vermischen. Dies erfordert jedoch den Nachweis von einzelnen Pollenkörnern und stellt damit hohe Ansprüche an die Empfindlichkeit der Methode. Die Ergebnisse zeigten, dass eine möglichst hohe laterale Auflösung, d.h. kleinere Pixelgröße unbedingt erforderlich war. Die Auftragung der Matrix als Tropfen in den Imaging-Experimenten erwies sich als nützlich und gewährleistete, anders als die aus der Literatur empfohlenen Sprüh- oder



Sublimationsmethoden, die ausreichende Extraktion der Analyten aus den Pollenkörnern.

Bei der Auswertung des Imaging-Ansatzes war dessen Kombination mit verschiedenen multivariaten Analysemethoden entscheidend. Nur diese ermöglichte es, die genaue lokale Position der Pollenkörner zu bestimmen und diese gleichzeitig zu identifizieren und klassifizieren. Dazu wurden bestimmte Verfahren, wie HCA und PCA getestet und optimiert. Zur direkten Nutzung derartiger multivariater Auswertungen während und nach der Spektrenaufnahme wurde eine graphische Benutzeroberfläche (GUI) erstellt, die es ermöglicht, den Einfluss von Parameteränderungen schnell darzustellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse das Potenzial der MALDI-TOF Massenspektrometrie und insbesondere des Imaging-Ansatzes als alternative Methode zum Nachweis und der Klassifizierung von Pollenkörnern verdeutlichen. Die Weiterentwicklung dieses Grenzgebietes aus Analytik und Biologie kann idealerweise nur durch eine multidisziplinäre Zusammenarbeit von Analytikern, Botanikern, Statistikern und Ökologen erfolgen. Um die konventionelle, mikroskopische Bestimmung von Pollenkörnern durch ein massenspektrometrisches Verfahren zu ergänzen oder zu ersetzen, sind in naher Zukunft weitere, konkrete Schritte notwendig, die kurz im folgenden Ausblick näher vorgestellt werden sollen. Dies sind I) die Automatisierung der Pollenkornsammlung und -auftragung, II) die Übertragung des Ansatzes auf reelle Feldproben und III) den Aufbau einer für die Identifizierung notwendigen Datenbank.

### **I - Automatisierung der Pollenkornsammlung und -auftragung**

Die Verwendung des leitfähigen Klebebandes im vorgestellten MS Ansatz (Kapitel 5.1.2.4) ähnelt stark dem in einer Pollenfalle realisierten Prinzip, Pollen auf einem mit Vaselinefilm-beschichteten Kunststoffband zu sammeln. In einem nächsten Schritt sollte die Probennahme in einer für die MALDI-TOF MS-Beprobung umgerüsteten Pollenfalle der TU Berlin erfolgen. Erste Kontakte bezüglich Tests einer Pollenfalle gibt es bereits.

In einem ersten Experiment wurde eine Vorrichtung erstellt, die auf einer in der Pollenfalle verwendeten Methodik des Ansaugens einer bestimmten Luftmenge beruht. Dazu wurden mehrere Pollenkörner in eine 2 l Glasflasche gegeben und mittels Stickstoffgasstroms auf ein Stück des Klebebandes fokussiert. Abbildung 6-1 illustriert den entsprechenden Versuchsaufbau. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die einzelnen Pollenkörner elektrostatisch an der Glaswandung hafteten, anstatt sich auf dem Klebeband abzusetzen. Die nachfolgenden MALDI-TOF Imaging-Messungen

konnten keine Pollen detektieren. An dieser Stelle ist eine weitere Optimierung notwendig, die zu einer zuverlässigen Sammlung von Pollenkörnern führt.



Abbildung 6-1: (links) Foto des Gefäßes mit den Pollenkörnern und (rechts) die N<sub>2</sub>-Luftstromübertragung der Pollenkörner auf den MALDI-Probenträger, über dem eine USB-Mikroskop-Kamera angebracht ist.

### II – Imaging-Messungen an unbekannten/realen Proben

Die Anwendbarkeit des MS Verfahrens auf unbekannte Feldproben wurde mit der in Abbildung 6-2 gezeigten Vorrichtung getestet. Dazu wurde ein handelsübliches Windrad (Abb. 6-2 links) mit einem Anemometer-Schalenkreuz (Abb. 6-2, rechts) kombiniert und im August 2018 während der Flugzeit von Gräserpollen an der BAM aufgestellt.



Abbildung 6-2: (links) Foto eines umgebauten Windrades mit (vergrößert rechts) einem Anemometer-Schalenkreuz um das doppelseitige Klebeband regengeschützt zu befestigen und Feldproben zu sammeln.

In dem vor Regen schützenden Schalenkreuz wurde das doppelseitige Klebeband in U-Form angebracht, in dem nur von der Frontseite die Haftfolie abgezogen wurde. Aufgrund des Windfangs und des drehbaren Schalenkreuzes richtete sich die Vorrichtung nach der herrschenden Windrichtung aus.

Eine erste Imaging-Messung von einem Stück des eingesetzten Klebebandes erfolgte nach Überführung des Klebebandes auf das MALDI-Target und anschließender on-Target-Probenpräparation. Abbildung 6-3 A zeigt drei ausgewählte Imaging-Messbereiche. In Abb. 6-3 B sind die jeweiligen Spektren übereinandergelegt (grau). Zusätzlich ist das Mittelwerts-Spektrum des Datensatzes (schwarz) dargestellt. In Abb. 6-3 C sind die TIC-Werte an den einzelnen Positionen des MSI Bereiches illustriert. Die ersten Messergebnisse (Abb. 6.3) zeigten keine eindeutigen Peakmuster, die sich mit einer der bekannten Proben vergleichen lassen können. Dabei ließ sich an Hand dieses ersten Experimentes nicht beurteilen, welchen Einfluss Expositionszeit und -ort bzw. das Vorhandensein und die Art von Pollen auf den ausgewählten Positionen hatten. Hier besteht weiterer, konkreter Forschungsbedarf.

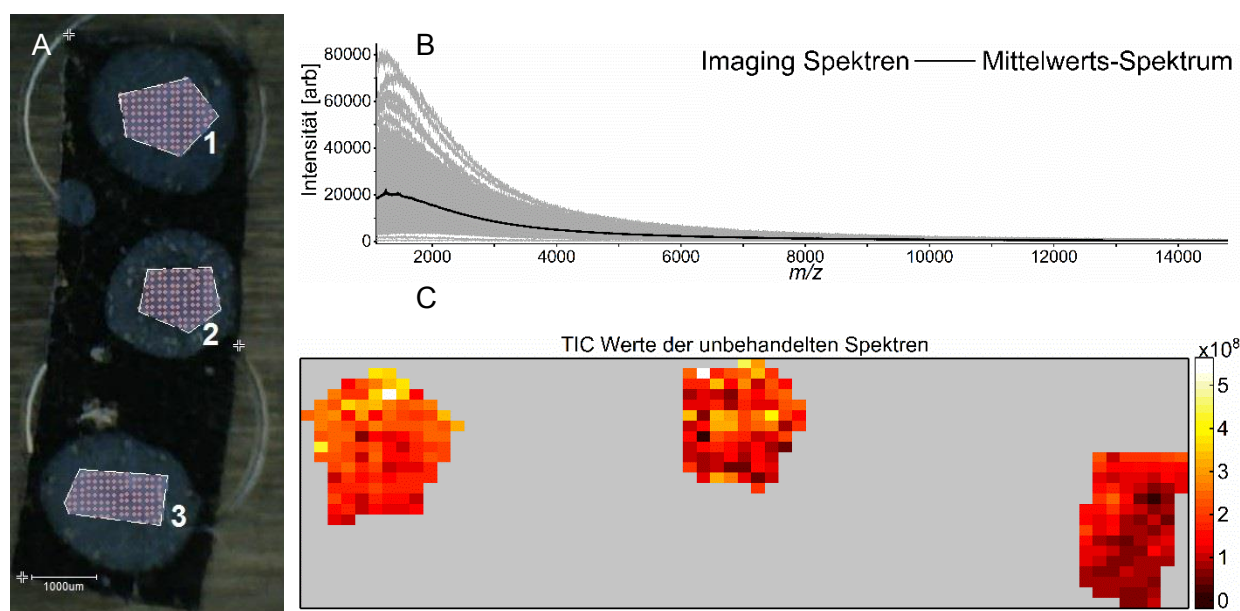


Abbildung 6-3: Imaging-Messung des, im Anemometer-Schalenkreuz angebrachten, leitfähigem Klebebandes, welches im August 2018 im Hof der BAM exponiert wurde. (A) zeigt die Positionen der gemessenen Spektren als lila Punkte an, in (B) sind die entsprechenden Spektren plus in schwarz das berechnete Mittelwerts-Spektrum gezeigt und in (C) sind die TIC-Werte Spektren an den entsprechenden Positionen zu sehen.

### III - Identifizierung realer Mischungen über eine Spektrendatenbank

Die in unserer Gruppe in den letzten Jahren gesammelten mehr als 400 Pollenproben sollen die Grundlage für eine Pollenspektrendatenbank bilden. Wie in dieser Dissertation gezeigt wurde, haben instrumentelle und experimentelle Faktoren einen Einfluss auf das MS-Spektrum eines Pollenkorns. Für den Aufbau einer Spektrendatenbank müssen daher geeignete Verfahren und Methoden definiert werden, um Identifizierung und Vergleichbarkeit der chemischen Fingerabdrücke zu ermöglichen. Das in diesem Projekt erarbeitete Mess- und Auswerteverfahren könnte eine Grundlage für die Entwicklung eines solchen

Standardprotokolls bilden. Selbst bei Fehlen passender Referenzproben wäre es in einer Spektrendatenbank möglich unbekannter Proben mit ähnlichen Arten, Gattungen oder Ordnungen zu korrelieren. Beispielsweise könnte die Korrelation solcher Spektren mit denen aus der Datenbank mit Hilfe eines Wertes belegt werden, der aus abweichenden Flächen zwischen den Spektren resultiert.

Eine mögliche Methode, die zeigt, wie unabhängige Spektren erfolgreich als Vergleichsdatenbank zum Einsatz kamen, wurde in Kapitel 5.3.3. demonstriert. Die breite Verteilung der einzelnen Gruppen im Scores-Plot (Abb. 5-36 A) wies jedoch auf Schwankungen hin.

Die Anwendung massenspektrometrischer Verfahren bietet darüber hinaus weitere Vorteile gegenüber mikroskopischen Verfahren. So zeigen erste Ergebnisse anderer Arbeiten, dass es in bestimmten Rahmen möglich ist, Umwelteinflüsse, wie z.B. den Standort, den Ernährungszustand oder Krankheiten der Pflanze an Hand von spezifischen Mustern in den Pollenkornspektren abzuleiten. [Diehn [321]] Die in diesem Ausblick vorgestellten Ideen zur weiteren Vereinfachung der in dieser Dissertation gezeigten Methoden bieten das Potential, Pollenanalysen von der individuellen, visuellen Beurteilung hin zu einem automatisierten, analytischen System weiterzuentwickeln.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
µm	Mikrometer
2D	Zweidimensionalität
3-AQ	3-Aminochinolin
4-HCCA	Cyanohydroxyzimtsäure
AC	AnchorChip <sup>TM</sup> - spezieller MALDI-Probenträger
ACN	Acetonitril
anemogam	Anemophilie, Windbestäubung, Windblütigkeit
AP	Atmosphärendruck
arb	engl. arbitrary units; willkürliche Einheit
AS	Ameisensäure
asLS	Methode des kleinsten, asymmetrischen Quadrates
ATR	engl. attenuated total reflection; Abgeschwächte Totalreflexion
AUC	engl. area under the curve; Fläche unter der Kurve
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BL	Basislinie
BS	Bernsteinsäure
CHIP-1000	Matrixspotter der Firma Shimadzu Scientific Instruments Inc.
CT	engl. conductive tape; doppelseitiges, leitfähiges Klebeband
Dalton (Da)	Ein Dalton, definiert als 1/12 der Masse eines <sup>12</sup> C-Atoms
DART	engl. Direct Analysis in Real Time; Ionisationsmethode in der MS
DCTB	Trans Tert-Butylphenyl Methylpropen Ylidene Malononitrile
deg	Grad des Polynoms
DESI	engl. Desorption Electrospray Ionisation; massenspektrometrische Messmethode
DHB	Dihydroxybenzoesäure, Gentisinsäure
DI	DUNN-Index
Dithranol	Dihydroxyanthrachinon
ESAirD	hauseigenes Matrix/LSM-Elektrospray Auftragungsapparatur
FT	Fourier-Transformation
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GUI	graphische Benutzeroberfläche
H <sub>2</sub> O	Wasser
HABA	Hydroxyphenylazo Benzoesäure
HCA	hierarchische Clusteranalyse
HCOOH	Ameisensäure

hydrogam	Hydrophilie, Wasserbestäubung, Wasserblütigkeit
Hz	Hertz (Einheit)
IAA	Indolyl Acrylsäure
ICA	engl. Independent Component Analysis; Unabhängigkeitsanalyse
IPA	Isopropylalkohol
IR	Infrarotspektroskopie
ITO	Indiumzinnoxid
kV	Kilovolt
LAMMA	engl. Laser-Microprobe-Mass-Analyzer
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LMMS	Laser Mikrosonden-Massenspektrometrie
LSM	Lösungsmittel
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MCP	engl. micro-channel plate; Mikrokanalplatte
MS	Massenspektrometrie
MSI	engl. MALDI-TOF Imaging MS; bildgebende MS
MTP	Mikrotiterplatte
MVA	multivariate Analyse
n	Anzahl (meist der gemittelten Spektren)
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NMF	nicht-negative Matrix-Faktorisierung
NN-PARAFAC	nicht-negative Faktorenanalyse
ns	Nanosekunden
OS	Oxalsäure
P	Pollenkornanzahl
PC	Hauptkomponente
PCA	engl. Principal Component Analysis; Hauptkomponentenanalyse
PEG	Polyethylenglycol
pLSA	probabilistische latente semantische Analyse
pLSR	partielle Least-Squares-Regression
pnBL	polynomialen Basislinienkorrektur
PPG	Polypropylenglycol
Raman	Raman-Spektroskopie
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SA	Sinapinsäure
SEM	engl. Scanning Electron Microscope; Rasterelektronenmikroskop
SERS	engl. Surface-enhanced Raman Scattering; oberflächenverstärkte Raman-Streuung
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie

---

SK	Silhouetten-Koeffizient
S-M	Silhouetten-Maximum
Spline	Polynomzug
Sporoderm	widerstandsfähige Außenwand eines Pollenkorns
Sym	Symmetrisch
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	engl. total ion current; Totalionenstrom, Summe der Signale
TOF	engl. time of flight; Flugzeit
UV	Ultraviolett
zoogam	Zoophilie, Tierbestäubung, Tierblütigkeit
ZS	Zitronensäure

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Schematische Darstellung von vier Arten der Probenpräparation. ....	8
Abbildung 4-1: (links) Foto der Airbrush-Pistole und (rechts) Foto der Vorrichtung mit verstellbarem Probenstisch unter einem Abzug. ....	24
Abbildung 4-2: (links) Foto des Matrix/LSM-Elektrospray-ESAirD Geräts und (rechts) Foto einer aufgespritzten Matrixspur auf einem polierten Stahlprobenträger. ....	25
Abbildung 4-3: (links) Foto des umgebauten Druckers und (rechts) Foto einer als Word-Beispielbild aufgedruckten Matrix auf dem Stahlprobenträger. ....	25
Abbildung 5-1: Summenspektren von <i>Corylus avellana</i> nach Akkumulation von 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 Laserpulsen derselben Stelle (MTP 384 Stahlträger, Probe, 1 µL HCOOH, 1 µL HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O v/v mit 1,25 % Trifluoressigsäure - TFA und 55 % „medium“-Laserintensität). ....	33
Abbildung 5-2: (A) Totalionenstrom fünf Wiederholungsmessungen bei unterschiedlicher Anzahl aufeinanderfolgenden Laserpulsen/Spektren und (B) Summe des TICs der fünf Messungen nach insgesamt 2000 Laserpulsen (MTP, Probe, 1 µL HCOOH, 1 µL HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % „medium“-Laserintensität). ....	33
Abbildung 5-3: Totalionenstrom pro Laserpuls bei Akkumulation unterschiedlicher Anzahl von Impulsen (MTP, Probe, 1 µL HCOOH, 1 µL HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % „medium“-Laserintensität). ....	34
Abbildung 5-4: Verschiedene Varianten der Einzelspektren-Akkumulation, d.h. gleiche Farbe – gleiche Summe von Laserpulsen. In (A) sind die TIC-Werte der Spektren bei 10 Wiederholungen dargestellt und in (B) ist der Mittelwert der Varianten mit Standardabweichung zu sehen (MTP, Probe, 1 µL HCOOH, 1 µL HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % „medium“-Laserintensität). ....	35
Abbildung 5-5: Drei ausgewählte Mittelwerts-Spektren der in Abb. 5-4 dargestellten TIC-Balken bei 500, 2x500 und 4x500 Laserpulsen (MTP, Probe, 1 µL HCOOH, 1 µL HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O v/v mit 1,25 % TFA und 55 %-medium-Laserintensität). ....	36
Abbildung 5-6: Verschiedene Varianten der Einzelspektren-Akkumulation, d.h. gleiche Farbe – gleiche Summe von Laserpulsen. Dargestellt sind die TIC-Mittelwerte der Spektren bei 10 Wiederholungen gemessen im <i>random walk</i> -Modus (MTP, Probe, 1 µL HCOOH, 1 µL HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % medium-Laserintensität). ....	37
Abbildung 5-7: Mittelwerts-Spektrum der <i>C. avellana</i> -Pollenprobe aus Abb. 5-5 hier gezeigt mit 42 ausgewählten Peaks, während die doppelt [M+2H] <sup>2+</sup> und einfach [M+H] <sup>+</sup> -geladenen Analyte-Kombinationen jeweils farblich identisch gekennzeichnet sind. ....	38
Abbildung 5-8: Proximity-Matrix von 42 Peaks aus dem <i>C. avellana</i> -Probenspektrum aus Abb. 5-5, gleiche $\Delta m/z$ -Werte sind unterstrichen und hervorgehoben. Mögliche doppelt geladene Analyten [M+2H] <sup>2+</sup> sind umrandet. ....	39
Abbildung 5-9: Schematische Darstellung des Mehrpunktlaserprofils bei den möglichen 5 Einstellungen des Smartbeam-Lasers. ....	40
Abbildung 5-10: Messung des Einflusses der Laserintensität, von 0-100 %, und Laserspotgröße, von mini < small < medium < large < ultra, auf die Summe der Signale (TIC) von je 10 Spektren pro gezeigtem Datenpunkt. ....	41



- Abbildung 5-11: Mittelwerts-Spektren der *C. avellana*-Pollenprobe in Abhängigkeit vom verwendeten Matrix-Suppression-Modus: (A) off, (B) deflection und (C) gating (MTP, Probe, 1  $\mu$ L HCOOH, 1  $\mu$ L HCCA in ACN:H<sub>2</sub>O v/v mit 1,25 % TFA und 55 % „medium“-Laserintensität mit *random walk* bei 1000 Laserpulsen pro Spektrum). .....42
- Abbildung 5-12: Vier ausgewählte Spektren der *C. avellana*-Pollenprobe zur Untersuchung der in Tabelle 5-2 aufgelisteten, eingerahmten Peak-Anzahl-Werte, gemessen mit folgenden Matrixsubstanzen: (A) HCCA, (B) HABA, (C) IAA und (D) SA (D) jeweils in H<sub>2</sub>O:ACN (TFA).46
- Abbildung 5-13: In drei Massenbereiche, d.h. 1000-3500, 3500-5000 und 5000-15000, unterteilter TIC-Wert von *C. avellana*-Pollenspektren, aufgenommen nach zusätzlicher Säurebehandlung während der Probenpräparation (500 Laserpulse, *random walk*, Laserfokus large, Laserintensität 75 %). .....47
- Abbildung 5-14: *C. avellana*-Pollenspektren (gemittelt aus Anzahl n) auf 6 verschiedenen Targets bei gleicher Probenvorbereitung (Überschichten mit 1 $\mu$ L HCOOH, Trocknen, Zugabe von 1 $\mu$ L HCCA-Matrix 10mg ml<sup>-1</sup>) und identischen Geräteparametern (Lasereinstellung *random walk*, Laserfokus large, Laserintensität 75 %, 500 Laserpulse). .....49
- Abbildung 5-15: Drei Massenspektren einer Peptidmischung, gemessen mit einem rapifleX®-Instrument, das mit einem höhenverstellbaren Probenstisch ausgestattet ist. Eine Variation von 25  $\mu$ m ergab eine Massenverschiebung von 0,2 Da für Somatostatin *m/z* 3147,47. ....50
- Abbildung 5-16-I: Mittelwerts-(n = 5)-Massenspektren von (1) *Corylus avellana*- und (2) *Alnus cordata*-Pollenproben. Senkrechte Spalten repräsentieren die verwendeten Probenträger: (a-c) Edelmetalltarget mit leitfähigem Klebeband und Matrixlösung mit und (d-f) ohne TFA, (g-i) Edelmetalltarget ohne leitfähiges Klebeband mit und (j-l) ohne TFA in der Matrixlösung; Waagrecht: Variation der Extraktionsverfahren: jeweils (oben) ohne zusätzliche Säureextraktion, (mittig) 3 min HCOOH-Gasphasenextraktion und (unten) HCOOH-Tropfenextraktion. ....52
- Abbildung 5-16-II: Mittelwerts-(n = 5)-Massenspektren von (3) *Pinus sylvestris*- und (4) *Betula tatewakiana*-Pollenproben. Senkrechte Spalten repräsentieren die verwendeten Probenträger: (a-c) Edelmetalltarget mit leitfähigem Klebeband und Matrixlösung mit und (d-f) ohne TFA, (g-i) Edelmetalltarget ohne leitfähiges Klebeband mit und (j-l) ohne TFA in der Matrixlösung; Waagrecht: Variation der Extraktionsverfahren: Jeweils (oben) ohne zusätzliche Säureextraktion, (mittig) 3 min HCOOH-Gasphasenextraktion und (unten) HCOOH-Tropfenextraktion. ....53
- Abbildung 5-17: Prinzipieller Ablauf einer PCA, hier gezeigt mit PC 1 und 2: Aus der Ausgangsmatrix, repräsentiert durch (A) 20 Massenspektren, werden (B) Score-Werte und (C) Loadings ermittelt. Die Datenvorbehandlung der Spektren (A) wird in den Methoden Kapitel 4.6 erläutert. ....54
- Abbildung 5-18: 12 PCAs mit Scores und Varianzen der PC 1 und 2 aus je 20 Spektren der *C. avellana*-(blau), *A. cordata*-(rot), *P. sylvestris*-(gelb) und *B. tatewakiana*-(grün)-Pollenproben bei unterschiedlicher Präparation (analog zu Abb. 5-16). .....55
- Abbildung 5-19: Loadings und Varianzen in Klammern der PC 1 in schwarz und PC 2 in grau der in Abb. 5-18 gezeigten PCAs. ....56
- Abbildung 5-20: Abgebildet sind (B/F) 20 Spektren jeweils nach ausgewählter Basislinienkorrektur und Normierung gefolgt von (C/G) den PCA Scores-Plots dieser

Spektren. Links und rechts davon sind die jeweils passenden Silhouetten angegeben und der Mittelwert (MW) aus Tab. 5-3 eingezeichnet.....	61
Abbildung 5-21: (A) zeigt die in Matlab gegebene Entwicklungsumgebung mit der Auswahl der Objekte, einer eingefügten Schaltfläche und dem Inspektor zum Ändern der Objekteigenschaften. (B) zeigt den von Matlab ausgegebenen Quellcode zu dieser untitled-GUI, mit der Callback-Funktion für die eingefügte Schaltfläche. ....	62
Abbildung 5-22: Gezeigt sind verschiedene Rechenschritte in der Ausführung der GUI: (A) der Upload der Spektren, (B) die Aufbereitung der Spektren über das proceeding, (C) die Ausführung einer HCA, (D) die GUI nach Ausführung einer PCA und zusätzlich gezeigt wird das Dropdown-Menü für die externe Speicherung der Daten. ....	63
Abbildung 5-23: (A-C) Mittelwerts-Spektren, wobei n für die Anzahl der interpolierten, basislinienkorrigierten, gemittelten Spektren steht, ausgewählter Pollenproben mit unterschiedlicher Anzahl von Pollenkörnern (P). ....	66
Abbildung 5-24: (A) Darstellung der 66 möglichen Kombinationen von Probenpunkten aus einer 3-er Mischung von jeweils 0-10 Pollenkörnern einer Spezies. Die 66 gemessenen, interpolierten und basislinienkorrigierten Spektren sind jeweils nach abnehmender Anzahl von Pollenkörnern für (B, blau) <i>C. avellana</i> , (C, rot) <i>A. cordata</i> oder (D, gelb) <i>P. sylvestris</i> angeordnet; (E) Darstellung des TIC der 66 Spektren. ....	67
Abbildung 5-25: TIC-normierte Ionendichte für einzelne Peaks aus der Serie der 66 Mischungsspektren: charakteristische Massen für <i>C. avellana</i> in blau mit $m/z$ (A) 2942, (B) 4100 und (C) 6106, für <i>A. cordata</i> in rot mit $m/z$ (D) 3440, (E) 5204 und (F) 6881 und für <i>P. sylvestris</i> in gelb mit $m/z$ (H) 3940 und (I) 4652. ....	69
Abbildung 5-26: (A) Die H-Matrix der nicht-negativen Matrix-Faktorisierung der Serie der 66 Mischungsspektren zeigt Faktorenladung für k 1 bis k 3. (B-D) Die W-Matrix der NMF enthält die dazugehörigen Faktorenwerte jedes Spektrums, welche für k 1 bis k 3 jeweils im simulierten Mischdreieck illustriert worden.....	71
Abbildung 5-27: In Vorbereitung von Pollenproben zur MALDI-TOF Imaging-Messung werden hier mögliche Optionen zum Auftragen der Matrixsubstanz schematisch dargestellt, genauer Tropfenauftragung, Airbrushverfahren, Elektrosprayverfahren, das Sieben oder das Drucken der Matrixsubstanz. ....	73
Abbildung 5-28: Imaging-Messungen bei vier verschiedenen Techniken der Matrixauftragung: HCCA in ACN:H <sub>2</sub> O (TFA) würde aufgetragen über (A) Tropfenpräparation, (B) Airbrushen, (C) Elektrosprayen bzw. (D) trockenem Sieben. Die erste Zeile zeigt den gemessenen Bereich, die Zweite die gemessenen Spektren und in der dritten Zeile ist der TIC bezogen auf die Position des jeweiligen Spektrums dargestellt. ....	74
Abbildung 5-29: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils <i>zehn</i> Pollenkörnern, Laserpunktabstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der vier größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums. ....	76
Abbildung 5-30: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils <i>fünf</i> Pollenkörnern, Laserpunktabstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der vier größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren	

eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums. ....	78
Abbildung 5-31: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils <i>drei</i> Pollenkörnern, Laserpunktabstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der vier größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums. ....	79
Abbildung 5-32: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus Pollenkörnern von drei Arten mit jeweils <i>einem</i> Pollenkorn, Laserpunktabstand 100 µm. (B) gemittelte Spektren der drei größten Cluster, bestimmt durch HCA, wobei n die Anzahl der gemittelten Spektren eines Clusters beschreibt. (C) farbliche Zuordnung der Clusterklassen zur Position des jeweiligen Spektrums. ....	80
Abbildung 5-33: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus jeweils <i>fünf</i> Pollenkörnern der drei Arten, Laserpunktabstand 50 µm. (B) Mittelwerts-Spektren der durch HCA bestimmten Cluster, wobei n die Anzahl der in einem Cluster gemittelten Spektren angibt. (C) HCA-Bild mit unterschiedlichen Farben für jedes Cluster. (D) PCA-Loadings der ersten drei PCs. (E) Positive und negative Bilder der PCA-Scores. ....	84
Abbildung 5-34: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus jeweils <i>drei</i> Pollenkörnern der drei Arten, Laserpunktabstand 50 µm. (B) Mittelwerts-Spektren der durch HCA bestimmten Cluster, wobei n die Anzahl der in einem Cluster gemittelten Spektren angibt. (C) HCA-Bild mit unterschiedlichen Farben für jedes Cluster. (D) PCA-Loadings der ersten drei PCs. (E) Positive und negative Bilder der PCA-Scores. ....	86
Abbildung 5-35: (A) Abbildung des Probenpunktes einer Mischung aus jeweils <i>einem</i> Pollenkorn der drei Arten, Laserpunktabstand 50 µm. (B) Mittelwerts-Spektren der durch HCA bestimmten Cluster, wobei n die Anzahl der in einem Cluster gemittelten Spektren angibt. (C) HCA-Bild mit unterschiedlichen Farben für jedes Cluster. (D) PCA-Loadings der ersten drei PCs. (E) Positive und negative Bilder der PCA-Scores. ....	88
Abbildung 5-36: (A/B) PCA von unabhängigen Referenzspektren aller Proben, die als (A) Loadings und (B) Scores-Werte für die ersten und zweiten PCs dargestellt werden. (C-F) Projektion der Imaging-Spektren in den gegebenen PCA-Raum: (C) enthält den Datensatz aus Abb. 5-33 mit 631 Spektren bei Mischung aus fünf Pollenkörnern jeder Art (D) zeigt die 870 Spektren der entsprechenden Mischung aus drei Pollenkörnern aus Abb. 5-34 und (E) die 622 Spektren aus Abb. 5-35 bei je einem Pollenkorn. ....	920
Abbildung 5-37: Jeweils in rot ist das Original-DART-Spektrum einer <i>A. absinthum</i> Pollenprobe zu sehen und dazu in schwarz die pchip-Interpolation (A), spline-Interpolation (B), das Resampling (C) und die 1-D Dateninterpolation (D) dieses Spektrums. ....	93
Abbildung 5-38: (A) zeigt die mit blauen Dreiecken markierten Peaks des Original-Spektrums berechnet über die findpeaks-Funktion, in (schwarz B) ist die neue Interpolation des entsprechenden <i>A. absinthum</i> -Pollenspektrum über den neu erzeugten Peak-Picking-Vektor gezeigt, während rot unterlegt das Original-Spektrum eingezeichnet ist. ....	94
Abbildung 5-39: In schwarz gezeigt sind drei mögliche Optionen zur Basislinienkorrektur des <i>A. absinthum</i> -Pollenspektrums, während rot hinterlegt das interpolierten Original-Spektrum zu sehen ist. ....	94

Abbildung 5-40: PCA der 19 DART-Spektren mit den Scores-Plots für (A) PC 1 vs. PC 2, (B) PC 1 vs. PC 3 (B) und (C) PC 2 vs. PC 3 und (D) den entsprechenden Loadings der ersten drei PCs. ....	95
Abbildung 5-41: (A-D) Selektive PCA von 8 DART-Spektren im dritten Präparationsschritt, d.h. mit TFA gemessen, mit den entsprechenden (A-C) Scores und (D) Loadings und (E-H) eine weiter PCA an 17 Harz-Hintergrund subtrahierten Spektren mit den entsprechenden (E-G) Scores und (H) Loadings. ....	97
Abbildung 6-1: (links) Foto des Gefäßes mit den Pollenkörnern und (rechts) die N <sub>2</sub> -Luftstromübertragung der Pollenkörner auf den MALDI-Probenträger, über dem eine USB-Mikroskop-Kamera angebracht ist. ....	100
Abbildung 6-2: (links) Foto eines umgebauten Windrades mit (vergrößert rechts) einem Anemometer-Schalenkreuz um das doppelseitige Klebeband regengeschützt zu befestigen und Feldproben zu sammeln. ....	100
Abbildung 6-3: Imaging-Messung des, im Anemometer-Schalenkreuz angebrachten, leitfähigem Klebebandes, welches im August 2018 im Hof der BAM exponiert wurde. (A) zeigt die Positionen der gemessenen Spektren als lila Punkte an, in (B) sind die entsprechenden Spektren plus in schwarz das berechnete Mittelwerts-Spektrum gezeigt und in (C) sind die TIC-Werte Spektren an den entsprechenden Positionen zu sehen. ....	101

## 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Übersicht über Einsatzgebiet, Name und Abkürzung möglicher MALDI-Matrizes.	7
Tabelle 4-1: In der Arbeit verwendete Chemikalien mit jeweiligem Verwendungszweck. ....	22
Tabelle 4-2: Übersicht möglicher Probenträger die im MALDI-Instrument verwendet werden können. ....	23
Tabelle 5-1: Löslichkeit von 6 Matrixsubstanzen in 7 Lösungsmitteln unter Anwendung zweier Bearbeitungsschritte, 1.Vortexmischer/rote Schriftfarbe; 2.Ultraschallbad/blau Schriftfarbe, evaluiert mit einer sechsstufigen Skala von - - - bis + + +. ....	44
Tabelle 5-2: Anzahl der Peaks aus den Spektren, die nach Auftragung der jeweiligen LSM-Matrix-Kombinationen gemessen wurden. Umrandete Werte wurden in Abb. 5-12 eingezeichnet in ihren jeweiligen Spektren gezeigt. ....	45
Tabelle 5-3: Berechnete Silhouetten-Koeffizienten für Normierungsverfahren (spaltenweise) und Basislinienkorrekturen (zeilenweise) zum einen basierend auf der Distanz der Spektren (Spalte 1-4) und zum anderen basierend auf der Distanz der Score-Werte von PC 1/PC2 (Spalte 5-8). ....	60
Tabelle 5-4 Berechnung des Silhouetten-Koeffizient (erste Zeile des jeweiligen Datensatzes), das Silhouetten-Maximum (zweite Zeile) und der DUNN-Index (dritte Zeile) der vier vorangegangenen gezeigten MALDI-TOF MSI-Datensätze (Abb. 5-29, -30, -31 und -32). ....	82
Tabelle 5-5: Statistische Auswertung der Größe von je 10 Pollenkörnern durch Mikroskopaufnahmen mit einer Olympus UC 90 Mikroskop-Kamera bei 20-facher Vergrößerung. ....	89

---

## 7.4 Literaturverzeichnis

1. Solomon, W. R.: How ill the wind? Issues in aeroallergen sampling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2003**, *112*, 3-8.
2. Schulte, F., Lingott, J., Panne, U., Kneipp, J.: Chemical Characterization and Classification of Pollen. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 9551-9556.
3. Seifert, S., Weidner, S. M., Panne, U., Kneipp, J.: Taxonomic relationships of pollens from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry data using multivariate statistics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2015**, *29*, 1145-1154.
4. Zimmermann, B.: Characterization of Pollen by Vibrational Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2010**, *64*, 1364-1373.
5. Krause, B., Seifert, S., Panne, U., Kneipp, J., Weidner, S. M.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric investigation of pollen and their classification by multivariate statistics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26*, 1032-1038.
6. Freiwald, A., Sauer, S.: Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols* **2009**, *4*, 732-742.
7. Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C. *et al.*: High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **2009**, *47*, 3732-3734.
8. Murray, P. R.: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* **2010**, *16*, 1626-1630.
9. De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., Vandamme, P.: Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and Applied Microbiology* **2011**, *34*, 20-29.
10. Welker, M., Moore, E. R.: Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology* **2011**, *34*, 2-11.
11. Lasch, P., Fleige, C., Stammler, M., Layer, F., Nubel, U., Witte, W., Werner, G.: Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **2014**, *100*, 58-69.
12. Santos, T., Capelo, J. L., Santos, H. M., Oliveira, I., Marinho, C., Goncalves, A., Araujo, J. E., Poeta, P., Igrejas, G.: Use of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting to characterize *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. *Journal of Proteomics* **2015**, *127*, 321-331.
13. Esteve, C., Canas, B., Moreno-Gordaliza, E., Del Rio, C., Garcia, M. C., Marina, M. L.: Identification of olive (*Olea europaea*) pulp proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 12093-12101.

14. Ernst, M., Silva, D. B., Silva, R., Monge, M., Semir, J., Vencio, R. Z., Lopes, N. P.: A metabolomic protocol for plant systematics by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2015**, 859, 46-58.
15. Copeland, R. A., Spiro, T. G.: Secondary structure determination in proteins from deep (192-223-nm) ultraviolet Raman spectroscopy. *Biochemistry* **1987**, 26, 2134-2139.
16. Rodgers, K. R., Spiro, T. G.: Nanosecond dynamics of the R -> T transition in hemoglobin: ultraviolet Raman studies. *Science* **1994**, 265, 1697-1699.
17. Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R.: The species concept for prokaryotic microorganisms — An obstacle for describing diversity? *Poiesis & Praxis* **2004**, 3, 62-72.
18. Rösch, P., Schmitt, M., Kiefer, W., Popp, J.: The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **2003**, 661, 363-369.
19. Rösch, P., Harz, M., Schmitt, M. *et al.*: Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 1626-1637.
20. López-Díez, E. C., Goodacre, R.: Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 585-591.
21. Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.-P. *et al.*: Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **2003**, 41, 324-329.
22. De Gussem, K., Vandenabeele, P., Verbeken, A., Moens, L.: Raman spectroscopic study of *Lactarius* spores (Russulales, Fungi). *Spectrochimica Acta Part A* **2005**, 61, 2896-2908.
23. Schulz, H., Baranska, M.: Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **2007**, 43, 13-25.
24. Bakker Schut, T. C., Witjes, M. J. H., Sterenborg, H. J. C. M., Speelman, O. C., Roodenburg, J. L. N., Marple, E. T., Bruining, H. A., Puppels, G. J.: In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 6010-6018.
25. Hanlon, E. B., Manoharan, R., Koo, T. W. *et al.*: Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine & Biology* **2000**, 45, R1.
26. Wu, D., He, Y., Feng, S.: Short-wave near-infrared spectroscopy analysis of major compounds in milk powder and wavelength assignment. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 610, 232-242.
27. El-Abassy, R. M., Donfack, P., Materny, A.: Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2009**, 86, 507-511.
28. Boyacı, I. H., Temiz, H. T., Uysal, R. S., Velioğlu, H. M., Yadegari, R. J. R., M. M.: A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy. *Food chemistry* **2014**, 148, 37-41.
29. Joseph, V., Schulte, F., Roach, H., Feldmann, I., Dorfel, I., Osterle, W., Panne, U., Kneipp, J.: Surface-enhanced Raman scattering with silver nanostructures generated

- in situ in a sporopollenin biopolymer matrix. *Chemical Communications* **2011**, 47, 3236-3238.
30. Seifert, S., Merk, V., Kneipp, J.: Identification of aqueous pollen extracts using surface enhanced Raman scattering (SERS) and pattern recognition methods. *Journal of Biophotonics* **2016**, 9, 181-189.
  31. Zimmermann, B., Kohler, A.: Infrared spectroscopy of pollen identifies plant species and genus as well as environmental conditions. *PLoS One* **2014**, 9, e95417.
  32. Bağcıoğlu, M., Kohler, A., Seifert, S., Kneipp, J., Zimmermann, B., McMahon, S.: Monitoring of plant-environment interactions by high-throughput FTIR spectroscopy of pollen. *Methods in Ecology and Evolution* **2017**, 8, 870-880.
  33. Mularczyk-Oliwa, M., Bombalska, A., Kaliszewski, M., Włodarski, M., Kopczyński, K., Kwaśny, M., Szpakowska, M., Trafny, E. A.: Comparison of fluorescence spectroscopy and FTIR in differentiation of plant pollens. *Spectrochimica Acta Part A* **2012**, 97, 246-254.
  34. Udelhoven, T., Naumann, D., Schmitt, J.: Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Applied Spectroscopy* **2000**, 54, 1471-1479.
  35. Nie, M., Zhang, W. Q., Xiao, M., Luo, J. L., Bao, K., Chen, J. K., Li, B.: FT-IR spectroscopy and artificial neural network identification of *Fusarium* species. *Journal of Phytopathology* **2007**, 155, 364-367.
  36. Zimmermann, B., Tkalec, Z., Mesic, A., Kohler, A.: Characterizing Aeroallergens by Infrared Spectroscopy of Fungal Spores and Pollen. *PLoS One* **2015**, 10, 22.
  37. Gorgulu, S. T., Dogan, M., Severcan, F.: The characterization and differentiation of higher plants by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2007**, 61, 300-308.
  38. Khairudin, K., Sukiran, N. A., Goh, H. H., Baharum, S. N., Noor, N. M.: Direct discrimination of different plant populations and study on temperature effects by Fourier transform infrared spectroscopy. *Metabolomics* **2014**, 10, 203-211.
  39. Kwon, Y. K., Ahn, M. S., Park, J. S., Liu, J. R., In, D. S., Min, B. W., Kim, S. W.: Discrimination of cultivation ages and cultivars of ginseng leaves using Fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. *Journal of Ginseng Research* **2014**, 38, 52-58.
  40. Izadiyan, P., Hemmateenejad, B., Taghavi, S. M., Izadiyan, M.: Discrimination of Shirazi thyme from thymus species and antioxidant activity prediction using chemometrics and FT-IR spectroscopy. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2018**, 15, 259-268.
  41. Schulz, H., Schrader, B., Quilitzsch, R., Pfeffer, S., Kruger, H.: Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 2475-2481.
  42. Kim, S. W., Min, S. R., Kim, J., Park, S. K., Kim, T. I., Liu, J. R.: Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. *Plant Biotechnology Reports* **2009**, 3, 87-93.
  43. Yao, X., Peng, Y., Zhou, Q., Xiao, P. G., Sun, S. Q.: Distinction of eight *Lycium* species by Fourier-transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation IR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **2010**, 974, 161-164.



44. Pappas, C. S., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Polissiou, M. G.: New method for pollen identification by FT-IR spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2003**, 57, 23-27.
45. Gottardini, E., Rossi, S., Cristofolini, F., Benedetti, L.: Use of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as a tool for pollen identification. *Aerobiologia* **2007**, 23, 211-219.
46. Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Chazallon, B., Facq, S., Lendl, B., Whitmore, K., Grothe, H.: Chemistry and morphology of dried-up pollen suspension residues. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, 44, 1654-1658.
47. Wolkers, W. F., Hoekstra, F. A.: Aging of dry desiccation-tolerant pollen does not affect protein secondary structure. *Plant Physiology* **1995**, 109, 907-915.
48. Wolkers, W. F., Hoekstra, F. A.: Heat stability of proteins in desiccation-tolerant cattail (*Typha latifolia* L.) pollen: a Fourier transform infrared spectroscopic study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **1997**, 117, 349-355.
49. Dell'Anna, R., Lazzeri, P., Frisanco, M., Monti, F., Malvezzi Campeggi, F., Gottardini, E., Bersani, M.: Pollen discrimination and classification by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and machine learning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 394, 1443-1452.
50. Bağcıoğlu, M., Zimmermann, B., Kohler, A.: A multiscale vibrational spectroscopic approach for identification and biochemical characterization of pollen. *PLoS One* **2015**, 10, e0137899.
51. Julier, A. C. M., Jardine, P. E., Coe, A. L., Gosling, W. D., Lomax, B. H., Fraser, W. T.: Chemotaxonomy as a tool for interpreting the cryptic diversity of Poaceae pollen. *Review of Palaeobotany and Palynology* **2016**, 235, 140-147.
52. Zimmermann, B., Tafintseva, V., Bağcıoğlu, M., Hoegh Berdahl, M., Kohler, A.: Analysis of Allergenic Pollen by FTIR Microspectroscopy. *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 803-811.
53. Zimmermann, B.: Chemical characterization and identification of Pinaceae pollen by infrared microspectroscopy. *Planta* **2018**, 247, 171-180.
54. Rodriguez-Solana, R., Daferera, D. J., Mitsi, C., Trigas, P., Polissiou, M., Tarantilis, P. A.: Comparative chemotype determination of Lamiaceae plants by means of GC-MS, FT-IR, and dispersive-Raman spectroscopic techniques and GC-FID quantification. *Industrial Crops and Products* **2014**, 62, 22-33.
55. Cinta-Pinzaru, S., Dehelean, C. A., Soica, C., Culea, M., Borcan, F.: Evaluation and differentiation of the Betulaceae birch bark species and their bioactive triterpene content using analytical FT-vibrational spectroscopy and GC-MS. *Chemistry Central Journal* **2012**, 6, 12.
56. Kienitz, H., Aulinger, F.: Massenspektrometrie. *Verlag Chemie*, **1968**.
57. Gross, J. H.: Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch. *Springer-Verlag Berlin*, Heidelberg, **2012**.
58. Cotter, R. J.: Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 1027a-1039a.
59. Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., Gordon, D. B.: The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* **1996**, 14, 1584-1586.
60. Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., Lay, J. O.: Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns

- using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 1227-1232.
61. Krishnamurthy, T., Ross, P. L.: Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 1992-1996.
62. Krishnamurthy, T., Ross, P. L., Rajamani, U.: Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 883-888.
63. Chen, P., Lu, Y., Harrington, P. B.: Application of linear and nonlinear discrete wavelet transforms to MALDI-MS measurements of bacteria for classification. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7218-7225.
64. Chen, P., Lu, Y., Harrington, P. B.: Biomarker profiling and reproducibility study of MALDI-MS measurements of *Escherichia coli* by analysis of variance-principal component analysis. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 1474-1481.
65. Boehme, K., Fernandez-No, I. C., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J. M., Calo-Mata, P., Canas, B.: Species Differentiation of Seafood Spoilage and Pathogenic Gram-Negative Bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. *Journal of Proteome Research* **2010**, *9*, 3169-3183.
66. Almuzara, M., Barberis, C., Traglia, G., Famiglietti, A., Ramirez, M. S., Vay, C.: Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for species identification of nonfermenting Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological Methods* **2015**, *112*, 24-27.
67. Fenselau, C., Demirev, P. A.: Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 157-171.
68. Vitale, R., Roine, E., Bamford, D. H., Corcelli, A.: Lipid fingerprints of intact viruses by MALDI-TOF/mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, *1831*, 872-879.
69. Giebel, R., Worden, C., Rust, S. M., Kleinheinz, G. T., Robbins, M., Sandrin, T. R.: Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. In *Advances in Applied Microbiology*, Laskin, A. I., Sariaslani, S., Gadd, G. M., Eds. Elsevier Academic Press Inc: San Diego, **2010**, Vol. 71, pp 149-184.
70. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S.: MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, 16.
71. Fujiwara, M.: Identifying interactions among salmon populations from observed dynamics. *Ecology* **2008**, *89*, 4-11.
72. Olate, V. R., Nachtigall, F. M., Santos, L. S., Soto, A., Araya, M., Oyanedel, S., Diaz, V., Marchant, V., Rios-Momberg, M.: Fast detection of *Piscirickettsia salmonis* in *Salmo salar* serum through MALDI-TOF-MS profiling. *Journal of Mass Spectrometry* **2016**, *51*, 200-206.
73. Ortea, I., Barros, L., Gallardo, J. M.: Closely Related Shrimp Species Identification by MALDI-ToF Mass Spectrometry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **2009**, *18*, 146-155.
74. Ortea, I., Canas, B., Gallardo, J. M.: Mass Spectrometry Characterization of Species-Specific Peptides from Arginine Kinase for the Identification of Commercially Relevant Shrimp Species. *Journal of Proteome Research* **2009**, *8*, 5356-5362.

75. Salla, V., Murray, K. K.: Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of shrimp. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 794, 55-59.
76. Kaftan, F., Vrkoslav, V., Kynast, P., Kulkarni, P., Bocker, S., Cvacka, J., Knaden, M., Svatos, A.: Mass spectrometry imaging of surface lipids on intact *Drosophila melanogaster* flies. *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, 49, 223-232.
77. Tandina, F., Almeras, L., Kone, A. K., Doumbo, O. K., Raoult, D., Parola, P.: Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. *Parasites & Vectors* **2016**, 9, 11.
78. Khalil, S. M., Pretzel, J., Becker, K., Spengler, B.: High-resolution AP-SMALDI mass spectrometry imaging of *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Mass Spectrometry* **2017**, 416, 1-19.
79. Yssouf, A., Flaudrops, C., Drali, R., Kernif, T., Socolovschi, C., Berenger, J. M., Raoult, D., Parola, P.: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification of Tick Vectors. *Journal of Clinical Microbiology* **2013**, 51, 522.
80. Nebbak, A., El Hamzaoui, B., Berenger, J. M., Bitam, I., Raoult, D., Almeras, L., Parola, P.: Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Medical and Veterinary Entomology* **2017**, 31, 438-448.
81. Kajiwar, H., Hinomoto, N., Gotoh, T.: Mass fingerprint analysis of spider mites (Acari) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid discrimination. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, 30, 1037-1042.
82. Welham, K. J., Domin, M. A., Johnson, K., Jones, L., Ashton, D. S.: Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, 14, 307-310.
83. Horneffer, V., Haverkamp, J., Janssen, H. G., ter Steeg, P. F., Notz, R.: MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: wet heat-treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, 15, 1444-1454.
84. Lasch, P., Nattermann, H., Erhard, M., Stämmer, M., Grunow, R., Bannert, N., Appel, B., Naumann, D.: MALDI-TOF Mass Spectrometry Compatible Inactivation Method for Highly Pathogenic Microbial Cells and Spores. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 2026-2034.
85. Beinhauer, J., Raus, M., Hanzalova, A., Horcicka, P., Sebela, M.: Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry and proteomic analysis of *Puccinia* pathogenic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta* **2016**, 1864, 1093-1103.
86. Druckenmüller, K., Gärtner, A., Jäckel, U., Klug, K., Schiffels, J., Günther, K., Elbers, G.: Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2017**, 220, 974-983.
87. Napoli, A., Aiello, D., Di Donna, L., Sajjad, A., Perri, E., Sindona, G.: Profiling of Hydrophilic Proteins from *Olea europaea* Olive Pollen by MALDI TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 3434-3443.

88. Pazouki, N., Sankian, M., Leung, P. T., Nejadstatti, T., Khavari-Nejad, R. A., Varasteh, A. R.: Identification of cyclophilin as a novel allergen from *Platanus orientalis* pollens by mass spectrometry. *J Biosci Bioeng* **2009**, 107, 215-217.
89. Weidner, S., Schultze, R. D., Enthaler, B.: Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry of pollen grains and their mixtures. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2013**, 27, 896-903.
90. Cliff, B., Weibel, D. E., Lockyer, N. P., Jungnickel, H., Stephens, G., Vickerman, J. C.: Detection of chlorinated pesticides on the surface of fungus using ToF-SIMS. *Applied Surface Science* **2003**, 203, 710-713.
91. Cliff, J. B., Jarman, K. H., Valentine, N. B., Golledge, S. L., Gaspar, D. J., Wunschel, D. S., Wahl, K. L.: Differentiation of spores of *Bacillus subtilis* grown in different media by elemental characterization using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 6524-6530.
92. Wei, W. C., Zhang, Y. Y., Komorek, R., Plymale, A., Yu, R. J., Wang, B. C., Zhu, Z. H., Liu, F. H., Yu, X. Y.: Characterization of syntrophic *Geobacter* communities using ToF-SIMS. *Biointerphases* **2017**, 12, 11.
93. Focardi, S., Ristori, S., Mazzuoli, S., Tognazzi, A., Leach-Scampavia, D., Castner, D. G., Rossi, C.: ToF-SIMS and PCA studies of Seggianese olives and olive oil. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, 279, 225-232.
94. Saito, K., Mitsutani, T., Imai, T., Matsushita, Y., Fukushima, K.: Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 1552-1557.
95. Saito, K., Watanabe, Y., Shirakawa, M. *et al.*: Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Plant Journal* **2012**, 69, 542-552.
96. Zhou, C. Z., Li, Q. Z., Chiang, V. L., Lucia, L. A., Griffis, D. P.: Chemical and Spatial Differentiation of Syringyl and Guaiacyl Lignins in Poplar Wood via Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 7020-7026.
97. McDougall, G. J., Martinussen, I., Junttila, O., Verrall, S., Stewart, D.: Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, 10860-10868.
98. Meetani, M. A., Shin, Y. S., Zhang, S. F., Mayer, R., Basile, F.: Desorption electrospray ionization mass spectrometry of intact bacteria. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 42, 1186-1193.
99. Cody, R. B., McAlpin, C. R., Cox, C. R., Jensen, K. R., Voorhees, K. J.: Identification of bacteria by fatty acid profiling with direct analysis in real time mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2015**, 29, 2007-2012.
100. Musah, R. A., Espinoza, E. O., Cody, R. B., Lesiak, A. D., Christensen, E. D., Moore, H. E., Maleknia, S., Drijfhout, F. P.: A High Throughput Ambient Mass Spectrometric Approach to Species Identification and Classification from Chemical Fingerprint Signatures. *Scientific Reports* **2015**, 5, 16.
101. Lane, A. L., Nyadong, L., Galhena, A. S. *et al.*: Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106, 7314-7319.

- 
102. Andras, T. D., Alexander, T. S., Gahlana, A., Parry, R. M., Fernandez, F. M., Kubanek, J., Wang, M. D., Hay, M. E.: Seaweed Allelopathy Against Coral: Surface Distribution of a Seaweed Secondary Metabolite by Imaging Mass Spectrometry. *Journal of Chemical Ecology* **2012**, 38, 1203-1214.
  103. Kato, L., Moraes, A. P., Oliveira, C. M. A., Vaz, B. G., Goncalves, L. D., Silva, E. C. E., Janfelt, C.: The Spatial Distribution of Alkaloids in *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerl and *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum Leaves Analysed by Desorption Electrospray Ionisation Mass Spectrometry Imaging. *Phytochemical Analysis* **2018**, 29, 69-76.
  104. de Abreu, L. B., Augusti, R., Schmidt, L., Dressler, V. L., Flores, E. M. D., Nascentes, C. C.: Desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) applied to the speciation of arsenic compounds from fern leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405, 7643-7651.
  105. Giffen, J. E., Lesiak, A. D., Dane, A. J., Cody, R. B., Musah, R. A.: Rapid Species-level Identification of *Salvias* by Chemometric Processing of Ambient Ionisation Mass Spectrometry-derived Chemical Profiles. *Phytochemical Analysis* **2017**, 28, 16-26.
  106. Lesiak, A. D., Cody, R. B., Dane, A. J., Musah, R. A.: Plant Seed Species Identification from Chemical Fingerprints: A High-Throughput Application of Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 8748-8757.
  107. Musah, R. A., Domin, M. A., Walling, M. A., Shepard, J. R. E.: Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal samples via direct analysis in real time mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, 26, 1109-1114.
  108. Honig, R. E., Woolston, J. R.: Laser-Induced Emission of Electrons, Ions, and Neutral Atoms from Solid Surfaces. *Applied Physics Letters* **1963**, 2, 138-139.
  109. Fenner, N. C., Daly, N. R.: Laser Used for Mass Analysis. *Review of Scientific Instruments* **1966**, 37, 1068-1070.
  110. Posthumus, M. A., Kistemaker, P. G., Meuzelaar, H. L. C., Ten Noever de Brauw, M. C.: Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Analytical Chemistry* **1978**, 50, 985-991.
  111. Schulten, H. R., Lehmann, W. D., Haaks, D.: LASER ASSISTED FIELD DESORPTION MASS-SPECTROMETRY. *Organic Mass Spectrometry* **1978**, 13, 361-365.
  112. Hillenkamp, F., Unsöld, E., Kaufmann, R., Nitsche, R.: LASER MICROPROBE MASS ANALYSIS OF ORGANIC MATERIALS. *Nature* **1975**, 256, 119-120.
  113. Hillenkamp, F., Unsöld, E., Kaufmann, R., Nitsche, R.: A high-sensitivity laser microprobe mass analyzer. *Applied physics* **1975**, 8, 341-348.
  114. Harrington, D. B.: The time-of-flight mass spectrometer. In *Advances in Mass Spectrometry*, Elsevier, **1959**, pp 249-265.
  115. Gohlke, R. S., McLafferty, F. W.: Early gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, 4, 367-371.
  116. Price, D., Milnes, G. J., Tayler, P. J., Scrivens, J. H., Blease, T. G.: Degradation of polymers studied by mass spectrometry. *Polymer degradation and stability* **1989**, 25, 307-323.
  117. Guilhaus, M., Mlynski, V., Selby, D.: Perfect timing: Time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 951-962.

118. Karas, M., Hillenkamp, F.: LASER DESORPTION IONIZATION OF PROTEINS WITH MOLECULAR MASSES EXCEEDING 10000 DALTONS. *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299-2301.
119. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T.: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, 2, 151-153.
120. Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften: Pressemitteilung vom 09.10.2002. **2002**, <https://kva.se/en/pressrum/pressmeddelanden/der-nobelpreis-in-chemie-2002-2>.
121. Andrews, D. L.: Encyclopedia of applied spectroscopy. *Wiley-VCH Weinheim, Germany*: **2009**.
122. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F.: MATRIX-ASSISTED ULTRAVIOLET-LASER DESORPTION OF NONVOLATILE COMPOUNDS. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53-68.
123. Knochenmuss, R., Zenobi, R.: MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews* **2003**, 103, 441-452.
124. Zenobi, R., Knochenmuss, R.: Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, 17, 337-366.
125. Dreisewerd, K.: The Desorption Process in MALDI. *Chemical Reviews* **2003**, 103, 395-425.
126. Knochenmuss, R.: MALDI ionization mechanisms: the coupled photophysical and chemical dynamics model correctly predicts 'temperature'-selected spectra. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, 48, 998-1004.
127. Karas, M., Bahr, U., Hillenkamp, F.: UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100 000 dalton range. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, 92, 231-242.
128. Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Hillenkamp, F.: Laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, 28, 760-761.
129. Karas, M., Gluckmann, M., Schafer, J.: Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 1-12.
130. George, M., Wellemans, J. M. Y., Cerny, R. L., Gross, M. L., Li, K., Cavalieri, E. L.: Matrix design for matrix-assisted laser desorption ionization: sensitive determination of PAH-DNA adducts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, 5, 1021-1025.
131. Laugesen, S., Roepstorff, P.: Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, 14, 992-1002.
132. Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Müller, M., Reichl, S., Arnold, K.: Lipid Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry: A Methodological Approach. *Analytical Biochemistry* **1999**, 267, 46-56.
133. Schiller, J., Suss, R., Arnhold, J. et al.: Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research* **2004**, 43, 449-488.

134. Cedervist, F. H., Zamfir, A. D., Bahrke, S., Eijssink, V. G., Sorlie, M., Peter-Katalinic, J., Peter, M. G.: Identification of a high-affinity-binding oligosaccharide by (+) nanoelectrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry of a noncovalent enzyme-ligand complex. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 2429-2434.
135. Nielen, M. W. F.: Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. *Mass Spectrometry Reviews* **1999**, 18, 309-344.
136. Westman, A., Huthfrehre, T., Demirev, P., Sundqvist, B. U. R.: Sample Morphology Effects in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 30, 206-211.
137. Arakawa, R., Watanabe, S., Fukuo, T.: Effects of sample preparation on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectra for sodium polystyrene sulfonate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, 13, 1059-1062.
138. Schuerenberg, M., Luebbert, C., Eickhoff, H., Kalkum, M., Lehrach, H., Nordhoff, E.: Prestructured MALDI-MS Sample Supports. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 3436-3442.
139. Nordhoff, E., Schürenberg, M., Thiele, G., Lübbert, C., Kloeppel, K.-D., Theiss, D., Lehrach, H., Gobom, J.: Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 226, 163-180.
140. Gabriel, S. J., Pfeifer, D., Schwarzingen, C., Panne, U., Weidner, S. M.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric imaging of synthetic polymer sample spots prepared using ionic liquid matrices. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, 28, 489-498.
141. Miki, A., Katagi, M., Kamata, T., Zaitso, K., Tatsuno, M., Nakanishi, T., Tsuchihashi, H., Takubo, T., Suzuki, K.: MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair. *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 46, 411-416.
142. Kuwayama, K., Yamamuro, T., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y. T., Inoue, H.: Utilization of matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry to search for cannabis in herb mixtures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, 406, 4789-4794.
143. Toh-Boyo, G. M., Wulff, S. S., Basile, F.: Comparison of sample preparation methods and evaluation of intra- and intersample reproducibility in bacteria MALDI-MS profiling. *Analytical Chemistry* **2012**, 84, 9971-9980.
144. Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M.: Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 3281-3287.
145. Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F.: 2, 5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1991**, 111, 89-102.
146. Lai, Y. H., Cai, Y. H., Lee, H., Ou, Y. M., Hsiao, C. H., Tsao, C. W., Chang, H. T., Wang, Y. S.: Reducing Spatial Heterogeneity of MALDI Samples with Marangoni Flows During Sample Preparation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2016**, 27, 1314-1321.
147. Kussmann, M., Nordhoff, E., Rahbek-Nielsen, H. *et al.*: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for

- various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 593-601.
148. Sugiura, Y., Shimma, S., Setou, M.: Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 8227-8235.
149. Jaskolla, T. W., Karas, M., Roth, U., Steinert, K., Menzel, C., Reihs, K.: Comparison between vacuum sublimed matrices and conventional dried droplet preparation in MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1104-1114.
150. Murphy, R. C., Hankin, J. A., Barkley, R. M., Zemski Berry, K. A.: MALDI imaging of lipids after matrix sublimation/deposition. *Biochimica et Biophysica Acta* **2011**, 1811, 970-975.
151. Körsgen, M., Pelster, A., Vens-Cappell, S., Roling, O., Arlinghaus, H. F.: Molecular ME-ToF-SIMS yield as a function of DHB matrix layer thicknesses obtained from brain sections coated by sublimation/deposition techniques. *Surface and Interface Analysis* **2016**, 48, 34-39.
152. Weidner, S., Kühn, G., Friedrich, J.: Infrared-matrix-assisted laser desorption/ionization and infrared-laser desorption/ionization investigations of synthetic polymers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12, 1373-1381.
153. Nordhoff, E., Ingendoh, A., Cramer, R., Overberg, A., Stahl, B., Karas, M., Hillenkamp, F., Crain, P. F., Chait, B.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, 6, 771-776.
154. Overberg, A., Karas, M., Bahr, U., Kaufmann, R., Hillenkamp, F.: Matrix-assisted infrared-laser (2.94  $\mu\text{m}$ ) desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1990**, 4, 293-296.
155. Dreisewerd, K., Berkenkamp, S., Leisner, A., Rohlfing, A., Menzel, C.: Fundamentals of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with pulsed infrared lasers. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 226, 189-209.
156. Cotter, R. J.: TOF Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research. *American Chemical Society*, Washington, DC, **1997**.
157. Menzel, C., Dreisewerd, K., Berkenkamp, S., Hillenkamp, F.: The Role of the Laser Pulse Duration in Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13, 975-984.
158. Holle, A., Haase, A., Kayser, M., Höhndorf, J.: Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, 41, 705-716.
159. Beavis, R. C., Chait, B. T.: Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3, 233-237.
160. Weickhardt, C., Moritz, F., Grotemeyer, J.: Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrometry Reviews* **1996**, 15, 139-162.
161. Guilhaus, M.: PRINCIPLES AND INSTRUMENTATION IN TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRY - PHYSICAL AND INSTRUMENTAL CONCEPTS. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 30, 1519-1532.



162. Ioanoviciu, D.: Ion-Optical solutions in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, 9, 985-997.
163. Wiza, J. L.: Microchannel plate detectors. *Nuclear Instruments & Methods* **1979**, 162, 587-601.
164. Laprade, B. N., Labich, R. J.: MICROCHANNEL PLATE-BASED DETECTORS IN MASS-SPECTROMETRY. *Spectroscopy* **1994**, 9, 26-&.
165. Schriemer, D. C., Li, L.: Mass discrimination its the analysis of polydisperse polymers by MALDI time-of-flight mass spectrometry .2. Instrumental issues. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4176-4183.
166. Schriemer, D. C., Li, L.: Mass discrimination in the analysis of polydisperse polymers by MALDI time-of-flight mass spectrometry .1. Sample preparation and desorption/ionization issues. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4169-4175.
167. Donegan, M., Tomlinson, A. J., Nair, H., Juhasz, P.: Controlling matrix suppression for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, 18, 1885-1888.
168. Bresler, K., Pyttel, S., Paasch, U., Schiller, J.: Parameters affecting the accuracy of the MALDI-TOF MS determination of the phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PC/LPC) ratio as potential marker of spermatozoa quality. *Chemistry and Physics of Lipids* **2011**, 164, 696-702.
169. Caprioli, R. M., Farmer, T. B., Gile, J.: Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4751-4760.
170. Chaurand, P., Schwartz, S. A., Caprioli, R. M.: Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6, 676-681.
171. Amstalden van Hove, E. R., Smith, D. F., Heeren, R. M.: A concise review of mass spectrometry imaging. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 3946-3954.
172. Amstalden van Hove, E. R., Blackwell, T. R., Klinkert, I., Eijkel, G. B., Heeren, R. M., Glunde, K.: Multimodal mass spectrometric imaging of small molecules reveals distinct spatio-molecular signatures in differentially metastatic breast tumor models. *Cancer Research* **2010**, 70, 9012-9021.
173. Castellino, S., Groseclose, M. R., Wagner, D.: MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis* **2011**, 3, 2427-2441.
174. Heeren, R. M.: Getting the picture: The coming of age of imaging MS. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, 377, 672-680.
175. Mullen, A. K., Clench, M. R., Crosland, S., Sharples, K. R.: Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, 19, 2507-2516.
176. Robinson, S., Warburton, K., Seymour, M., Clench, M., Thomas-Oates, J.: Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytologist* **2007**, 173, 438-444.
177. Peukert, M., Matros, A., Lattanzio, G., Kaspar, S., Abadía, J., Mock, H. P.: Spatially resolved analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI). *New Phytologist* **2012**, 193, 806-815.

178. Zaima, N., Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Setou, M.: Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, 24, 2723-2729.
179. Yoshimura, Y., Zaima, N., Moriyama, T., Kawamura, Y.: Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS One* **2012**, 7, e31285.
180. Berisha, A., Dold, S., Guenther, S., Desbenoit, N., Takats, Z., Spengler, B., Rompp, A.: A comprehensive high-resolution mass spectrometry approach for characterization of metabolites by combination of ambient ionization, chromatography and imaging methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, 28, 1779-1791.
181. Shroff, R., Schramm, K., Jeschke, V., Nemes, P., Vertes, A., Gershenzon, J., Svatos, A.: Quantification of plant surface metabolites by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry imaging: glucosinolates on *Arabidopsis thaliana* leaves. *The Plant Journal* **2015**, 81, 961-972.
182. Hölscher, D., Shroff, R., Knop, K., Gottschaldt, M., Crecelius, A., Schneider, B., Heckel, D. G., Schubert, U. S., Svatos, A.: Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *The Plant Journal* **2009**, 60, 907-918.
183. Jun, J. H., Song, Z., Liu, Z., Nikolau, B. J., Yeung, E. S., Lee, Y. J.: High-Spatial and High-Mass Resolution Imaging of Surface Metabolites of *Arabidopsis thaliana* by Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry Using Colloidal Silver. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 3255-3265.
184. Vrkoslav, V., Muck, A., Cvačka, J., Svatoš, A.: MALDI imaging of neutral cuticular lipids in insects and plants. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21, 220-231.
185. Sarsby, J., Towers, M. W., Stain, C., Cramer, R., Koroleva, O. A.: Mass spectrometry imaging of glucosinolates in *Arabidopsis* flowers and siliques. *Phytochemistry* **2012**, 77, 110-118.
186. Bhandari, D. R., Wang, Q., Friedt, W., Spengler, B., Gottwald, S., Rompp, A.: High resolution mass spectrometry imaging of plant tissues: towards a plant metabolite atlas. *Analyst* **2015**, 140, 7696-7709.
187. McDonnell, L. A., Heeren, R. M.: Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, 26, 606-643.
188. Kompauer, M., Heiles, S., Spengler, B.: Autofocusing MALDI mass spectrometry imaging of tissue sections and 3D chemical topography of nonflat surfaces. *Nature Methods* **2017**, 14, 1156.
189. Hölscher, D., Fuchser, J., Knop, K., Menezes, R. C., Buerkert, A., Svatoš, A., Schubert, U. S., Schneider, B.: High resolution mass spectrometry imaging reveals the occurrence of phenylphenalenone-type compounds in red paracytic stomata and red epidermis tissue of *Musa acuminata* ssp. *zebrina* cv. 'Rowe Red'. *Phytochemistry* **2015**, 116, 239-245.
190. Klerk, L. A., Broersen, A., Fletcher, I. W., van Liere, R., Heeren, R. M. A.: Extended data analysis strategies for high resolution imaging MS: New methods to deal with extremely large image hyperspectral datasets. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 260, 222-236.

191. Alexandrov, T., Kobarg, J. H.: Efficient spatial segmentation of large imaging mass spectrometry datasets with spatially aware clustering. *Bioinformatics* **2011**, 27, i230-i238.
192. Race, A. M., Steven, R. T., Palmer, A. D., Styles, I. B., Bunch, J.: Memory Efficient Principal Component Analysis for the Dimensionality Reduction of Large Mass Spectrometry Imaging Data Sets. *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 3071-3078.
193. Fonville, J. M., Carter, C. L., Pizarro, L. *et al.*: Hyperspectral visualization of mass spectrometry imaging data. *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 1415-1423.
194. Amigo, J. M., Babamoradi, H., Elcoroaristizabal, S.: Hyperspectral image analysis. A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **2015**, 896, 34-51.
195. Gut, Y., Boiret, M., Bultel, L., Renaud, T., Chetouani, A., Hafiane, A., Ginot, Y. M., Jennane, R.: Application of chemometric algorithms to MALDI mass spectrometry imaging of pharmaceutical tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, 105, 91-100.
196. Race, A. M., Bunch, J.: Optimisation of colour schemes to accurately display mass spectrometry imaging data based on human colour perception. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, 407, 2047-2054.
197. McCombie, G., Staab, D., Stoeckli, M., Knochenmuss, R.: Spatial and spectral correlations in MALDI mass spectrometry images by clustering and multivariate analysis. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 6118-6124.
198. Hanselmann, M., Kirchner, M., Renard, B. Y., Amstalden, E. R., Glunde, K., Heeren, R. M. A., Hamprecht, F. A.: Concise Representation of Mass Spectrometry Images by Probabilistic Latent Semantic Analysis. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 9649-9658.
199. Diehl, H. C., Beine, B., Elm, J., Trede, D., Ahrens, M., Eisenacher, M., Marcus, K., Meyer, H. E., Henkel, C.: The challenge of on-tissue digestion for MALDI MSI- a comparison of different protocols to improve imaging experiments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, 407, 2223-2243.
200. Schramm, T., Hester, A., Klinkert, I. *et al.*: imzML - A common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data. *Journal of Proteomics* **2012**, 75, 5106-5110.
201. Kallback, P., Nilsson, A., Shariatgorji, M., Andren, P. E.: mslQuant--Quantitation Software for Mass Spectrometry Imaging Enabling Fast Access, Visualization, and Analysis of Large Data Sets. *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 4346-4353.
202. Race, A. M., Palmer, A. D., Dexter, A., Steven, R. T., Styles, I. B., Bunch, J.: SpectralAnalysis: Software for the Masses. *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 9451-9458.
203. Chaurand, P., Schwartz, S. A., Reyzer, M. L., Caprioli, R. M.: Imaging mass spectrometry: principles and potentials. *Toxicologic Pathology* **2005**, 33, 92-101.
204. Chaurand, P., Norris, J. L., Cornett, D. S., Mobley, J. A., Caprioli, R. M.: New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **2006**, 5, 2889-2900.
205. Hankin, J. A., Barkley, R. M., Murphy, R. C.: Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18, 1646-1652.

- 
206. Baluya, D. L., Garrett, T. J., Yost, R. A.: Automated MALDI Matrix Deposition Method with Inkjet Printing for Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 6862-6867.
207. Goodwin, R. J. A., Dungworth, J. C., Cobb, S. R., Pitt, A. R.: Time-dependent evolution of tissue markers by MALDI-MS imaging. *Proteomics* **2008**, *8*, 3801-3808.
208. Kaletas, B. K., van der Wiel, I. M., Stauber, J., Dekker, L. J., Guzel, C., Kros, J. M., Luider, T. M., Heeren, R. M. A.: Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics* **2009**, *9*, 2622-2633.
209. Mounfield, W. P., Garrett, T. J.: Automated MALDI Matrix Coating System for Multiple Tissue Samples for Imaging Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23*, 563-569.
210. Thomas, A., Charbonneau, J. L., Fournaise, E., Chaurand, P.: Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 2048-2054.
211. Hoffmann, T., Dorrestein, P. C.: Homogeneous Matrix Deposition on Dried Agar for MALDI Imaging Mass Spectrometry of Microbial Cultures *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2015**, *26*, 1959-1962.
212. Delvolve, A. M., Woods, A. S.: Optimization of automated matrix deposition for biomolecular mapping using a spotter. *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *46*, 1046-1050.
213. Bouschen, W., Schulz, O., Eikel, D., Spengler, B.: Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 355-364.
214. Aerni, H. R., Cornett, D. S., Caprioli, R. M.: Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 827-834.
215. Wang, H. Y., Wu, H. W., Tsai, P. J., Liu, C. B., Zheng, Z. F.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of cardiolipins in rat organ sections. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 565-575.
216. Bordas-Le Floch, V., Groeme, R., Chabre, H., Baron-Bodo, V., Nony, E., Mascarell, L., Moingeon, P.: New insights into ragweed pollen allergens. *Current Allergy and Asthma Reports* **2015**, *15*, 63.
217. Radauer, C., Breiteneder, H.: Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2006**, *117*, 141-147.
218. Raftery, M. J., Saldanha, R. G., Geczy, C. L., Kumar, R. K.: Mass spectrometric analysis of electrophoretically separated allergens and proteases in grass pollen diffusates. *Respiratory Research* **2003**, *4*, 1-12.
219. Asensio, T., Crespo, J. F., Sanchez-Monge, R., Lopez-Torreon, G., Somoza, M. L., Rodriguez, J., Salcedo, G.: Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2004**, *114*, 896-899.
220. Breiteneder, H., Clare Mills, E. N.: Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances* **2005**, *23*, 395-399.

- 
221. Breiteneder, H., Mills, E. N.: Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, 115, 14-23.
222. Breiteneder, H., Radauer, C.: A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2004**, 113, 821-830.
223. Radauer, C., Breiteneder, H.: Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2007**, 120, 518-525.
224. Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H.: Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2008**, 121, 847-552.
225. Jenkins, J. A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P. R., Breiteneder, H., Mills, E. N.: Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, 115, 163-170.
226. Verdino, P.: Structural characterization of pollen allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **2006**, 30, 73-95.
227. Chapman, M. D., Pomes, A., Breiteneder, H., Ferreira, F.: Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2007**, 119, 414-420.
228. Iraneta, S. G., Acosta, D. M., Duran, R., Apicella, C., Orlando, U. D., Seoane, M. A., Alonso, A., Duschak, V. G.: MALDI-TOF MS analysis of labile *Lolium perenne* major allergens in mixes. *Clinical and Experimental Allergy* **2008**, 38, 1391-1399.
229. Lauer, I., Alessandri, S., Pokoj, S., Reuter, A., Conti, A., Vieths, S., Scheurer, S.: Expression and characterization of three important panallergens from hazelnut. *Molecular Nutrition & Food Research* **2008**, 52, S262-S271.
230. Shakib, F., Ghaemmaghani, A. M., Sewell, H. F.: The molecular basis of allergenicity. *Trends in Immunology* **2008**, 29, 633-642.
231. Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H.: Determinants of allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2009**, 123, 558-566.
232. Karp, C. L.: Guilt by intimate association: what makes an allergen an allergen? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2010**, 125, 955-960.
233. Seppala, U., Daulay, C., Robinson, S., Hornshaw, M., Larsen, J. N., Ipsen, H.: Absolute quantification of allergens from complex mixtures: a new sensitive tool for standardization of allergen extracts for specific immunotherapy. *Journal of Proteome Research* **2011**, 10, 2113-2122.
234. Bashir, M. E., Lui, J. H., Palnivalu, R., Naclerio, R. M., Preuss, D.: Pollen lipidomics: lipid profiling exposes a notable diversity in 22 allergenic pollen and potential biomarkers of the allergic immune response. *PLoS One* **2013**, 8, e57566.
235. Nakamura, R., Teshima, R.: Proteomics-based allergen analysis in plants. *Journal of Proteomics* **2013**, 93, 40-49.
236. Campbell, B. C., Gilding, E. K., Timbrell, V. et al.: Total transcriptome, proteome, and allergome of Johnson grass pollen, which is important for allergic rhinitis in subtropical regions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2015**, 135, 133-142.
237. Schenk, M. F., Gilissen, L. J., Smulders, R. J., America, T. H.: Mass spectrometry and pollen allergies. *Expert Review of Proteomics* **2010**, 7, 627-630.

238. Saha, B., Sircar, G., Pandey, N., Gupta Bhattacharya, S.: Mining Novel Allergens from Coconut Pollen Employing Manual De Novo Sequencing and Homology-Driven Proteomics. *Journal of Proteome Research* **2015**, 14, 4823-4833.
239. Hirst, J. M.: An automatic volumetric spore trap. *Annals of applied Biology* **1952**, 39, 257-265.
240. MacHardy, W. E., Gadoury, D. M.: Forecasting the seasonal maturation of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **1985**, 75, 381-385.
241. Stanley, R., Linskens, H. F.: Pollen: Biology Biochemistry Management. *Springer-Verlag Berlin*, New York, **1974**.
242. Doyle, J. A., Campo, M. V., Lugardon, B.: Observations on exine structure of Eucommiidites and Lower Cretaceous angiosperm pollen. **1975**, 17.
243. Straka, H.: Pollen-und Sporenkunde. Eine Einführung in die Palynologie. Grundbegriffe der modernen Biologie. Stuttgart, **1975**.
244. Blackmore, S., Ferguson, I. K.: Pollen and spores: form and function. *Academic Press*, **1986**, Vol. 12.
245. Vinckier, S., Huysmans, S., Smets, E.: Morphology and ultrastructure of orbicules in the subfamily Ixoroideae (Rubiaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology* **2000**, 108, 151-174.
246. Furness, C. A.: Why does some pollen lack apertures? A review of inaperturate pollen in eudicots. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2007**, 155, 29-48.
247. Piffanelli, P., Ross, J. H. E., Murphy, D. J.: Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* **1998**, 11, 65-80.
248. Jauh, G. Y., Lord, E. M.: Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longitiorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* **1996**, 199, 251-261.
249. Miki, K., Kawashima, S., Fujita, T., Nakamura, K., Clot, B.: Effect of micro-scale wind on the measurement of airborne pollen concentrations using volumetric methods on a building rooftop. *Atmospheric Environment* **2017**, 158, 1-10.
250. France, I., Duller, A. W. G., Duller, G. A. T., Lamb, H. F.: A new approach to automated pollen analysis. *Quaternary Science Reviews* **2000**, 19, 537-546.
251. Holt, K. A., Bennett, K. D.: Principles and methods for automated palynology. *New Phytologist* **2014**, 203, 735-742.
252. Schulte, F., Mäder, J., Kroh, L. W., Panne, U., Kneipp, J.: Characterization of pollen carotenoids with in situ and high-performance thin-layer chromatography supported resonant Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 8426-8433.
253. Schulte, F., Panne, U., Kneipp, J.: Molecular changes during pollen germination can be monitored by Raman microspectroscopy. *Journal of Biophotonics* **2010**, 3, 542-547.
254. Driessen, M. N. B. M., Willemse, M. T. M., Van Luijn, J. A. G.: Grass pollen grain determination by light-and UV-microscopy. *Grana* **1989**, 28, 115-122.
255. Mitsumoto, K., Yabusaki, K., Aoyagi, H.: Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2009**, 107, 90-94.
256. Liang, M., Zhang, P., Shu, X., Liu, C., Shu, J.: Characterization of pollen by MALDI-TOF lipid profiling. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, 334, 13-18.

- 
257. Westphal, S., Kolarich, D., Foetisch, K. *et al.*: Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (beta-fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 1327-1337.
258. Sheoran, I. S., Ross, A. R., Olson, D. J., Sawhney, V. K.: Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *Journal of Experimental Botany* **2007**, *58*, 3525-3535.
259. Erler, A., Hawranek, T., Kruckemeier, L., Asam, C., Egger, M., Ferreira, F., Briza, P.: Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins. *Proteomics* **2011**, *11*, 1486-1498.
260. Tremblay, R. R., Bourassa, S., Nehmé, B., Calvo, E. L.: Daylily protein constituents of the pollen and stigma a proteomics approach. *Journal of Plant Physiology* **2017**, *212*, 1-12.
261. Kalaycıoglu, Z., Kaygusuz, H., Döker, S., Kolaylı, S., Erim, F. B.: Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology* **2017**, *84*, 402-408.
262. Chow, L. P., Chiu, L. L., Khoo, K. H., Peng, H. J., Yang, S. Y., Huang, S. W., Su, S. N.: Purification and structural analysis of the novel glycoprotein allergen Cyn d 24, a pathogenesis-related protein PR-1, from Bermuda grass pollen. *Febs Journal* **2005**, *272*, 6218-6227.
263. Zeleny, R., Altmann, F., Praznik, W.: Structural characterization of the N-linked oligosaccharides from tomato fruit. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 199-210.
264. Kimura, Y., Suzuki, M., Kimura, M.: N-linked oligosaccharides of glycoproteins from Ginkgo biloba pollen, an allergenic pollen. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2001**, *65*, 2001-2006.
265. Xiao, X., Miller, L. L., Parchert, K. J., Hayes, D., Hochrein, J. M.: Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for the rapid identification of pollens and semi-quantification of flavonoid fingerprints. *Rapid Communication Mass Spectrometry* **2016**, *30*, 1639-1646.
266. Moore, S. E., Hemsley, A. R., French, A. N., Dudley, E., Newton, R. P.: New insights from MALDI-ToF MS, NMR, and GC-MS: mass spectrometry techniques applied to palynology. *Protoplasma* **2006**, *228*, 151-157.
267. Lauer, F., Seifert, S., Kneipp, J., Weidner, S. M.: Simplifying the preparation of pollen grains for MALDI-TOF MS classification. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 543.
268. Beleites, C., Neugebauer, U., Bocklitz, T., Krafft, C., Popp, J.: Sample size planning for classification models. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *760*, 25-33.
269. Engel, J., Gerretzen, J., Szymańska, E., Jansen, J. J., Downey, G., Blanchet, L., Buydens, L. M. C.: Breaking with trends in pre-processing?. *Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *50*, 96-106.
270. Norris, J. L., Cornett, D. S., Mobley, J. A., Andersson, M., Seeley, E. H., Chaurand, P., Caprioli, R. M.: Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *260*, 212-221.
271. Gerretzen, J., Szymanska, E., Jansen, J. J., Bart, J., van Manen, H. J., van den Heuvel, E. R., Buydens, L. M.: Simple and Effective Way for Data Preprocessing

- Selection Based on Design of Experiments. *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 12096-12103.
272. Schwartz, M., Meyer, B., Wirtzner, B., Hopf, C.: Standardized processing of MALDI imaging raw data for enhancement of weak analyte signals in mouse models of gastric cancer and Alzheimer's disease. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, 407, 2255-2264.
273. Bohling, G.: Dimension reduction and cluster analysis. *EECS* **2006**, 833.
274. Eijkel, G. B., Kaletas, B. K., van der Wiel, I. M., Kros, J. M., Luiders, T. M., Heeren, R. M. A.: Correlating MALDI and SIMS imaging mass spectrometric datasets of biological tissue surfaces. *Surface and Interface Analysis* **2009**, 41, 675-685.
275. Paatero, P., Tapper, U.: Positive matrix factorization: A non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values. *Environmetrics* **1994**, 5, 111-126.
276. Lee, D. D., Seung, H. S.: Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature* **1999**, 401, 788.
277. Hoyer, P. O.: Non-negative matrix factorization with sparseness constraints. *Journal of machine learning research* **2004**, 5, 1457-1469.
278. Donoho, D., Stodden, V.: When does non-negative matrix factorization give a correct decomposition into parts?. *Advances in Neural Information Processing Systems*, **2004**, pp 1141-1148.
279. Li, S. Z., Hou, X. W., Zhang, H. J., Cheng, Q. S.: Learning spatially localized, parts-based representation. *Computer Vision and Pattern Recognition*. Proceedings of the 2001 IEEE Computer Society Conference, **2001**, pp. I-I.
280. Kessler, W.: Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik: ein Lehrbuch. Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
281. Fiedler, J.: Market Segmentation: Clustering on Factor Scores versus Individual Variables. *Paper Presented to the AMA Advanced Research Techniques Forum* **1993**.
282. Bro, R., Smilde, A. K.: Principal component analysis. *Analytical Methods* **2014**, 6, 2812-2831.
283. Grasel, F. D., Ferrao, M. F., Wolf, C. R.: Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A* **2016**, 153, 94-101.
284. Jolliffe, I. T.: Graphical representation of data using principal components. *Principal component analysis* **2002**, 78-110.
285. Krzanowski, W. J., Jonathan, P., McCarthy, W. V., Thomas, M. R.: Discriminant analysis with singular covariance matrices: methods and applications to spectroscopic data. *Applied statistics* **1995**, 101-115.
286. Krzanowski, W. J., Kline, P.: Cross-validation for choosing the number of important components in principal component analysis. *Multivariate Behavioral Research* **1995**, 30, 149-165.
287. Seber, G. A. F.: Multivariate observations. **1984**.
288. Ilin, A., Raiko, T.: Practical approaches to principal component analysis in the presence of missing values. *Journal of machine learning research* **2010**, 11, 1957-2000.



- 
289. Joester, M., Seifert, S., Emmerling, F., Kneipp, J.: Physiological influence of silica on germinating pollen as shown by Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics* **2017**, 10, 542-552.
290. Reinmuth-Selzle, K., Kampf, C. J., Lucas, K. *et al.*: Air Pollution and Climate Change Effects on Allergies in the Anthropocene: Abundance, Interaction, and Modification of Allergens and Adjuvants. *Environmental Science & Technology* **2017**, 51, 4119-4141.
291. Gan, F., Ruan, G., Mo, J.: Baseline correction by improved iterative polynomial fitting with automatic threshold. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2006**, 82, 59-65.
292. Boelens, H. F. M., Dijkstra, R. J., Eilers, P. H. C., Fitzpatrick, F., Westerhuis, J. A.: New background correction method for liquid chromatography with diode array detection, infrared spectroscopic detection and Raman spectroscopic detection. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1057, 21-30.
293. Eilers, P. H. C.: Parametric time warping. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 404-411.
294. Eilers, P. H. C., De Menezes, R. X.: Quantile smoothing of array CGH data. *Bioinformatics* **2004**, 21, 1146-1153.
295. Schnabel, S. K., Eilers, P. H. C.: Optimal expectile smoothing. *Computational Statistics & Data Analysis* **2009**, 53, 4168-4177.
296. Andrade, L., Manolakos, E. S.: Signal background estimation and baseline correction algorithms for accurate DNA sequencing. *Journal of VLSI signal processing systems for signal, image and video technology* **2003**, 35, 229-243.
297. Todd, J. F. J.: Recommendations for Nomenclature and Symbolism for Mass Spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, 142, 209-240.
298. Price, P.: STANDARD DEFINITIONS OF TERMS RELATING TO MASS-SPECTROMETRY - A REPORT FROM THE COMMITTEE ON MEASUREMENTS AND STANDARDS OF THE AMERICAN-SOCIETY-FOR-MASS-SPECTROMETRY. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1991**, 2, 336-348.
299. Wagner, M., Naik, D., Pothen, A.: Protocols for disease classification from mass spectrometry data. *Proteomics* **2003**, 3, 1692-1698.
300. Satten, G. A., Datta, S., Moura, H., Woolfitt, A. R., Carvalho, M. D. G., Carlone, G. M., De Barun, K., Pavlopoulos, A., Barr, J. R.: Standardization and denoising algorithms for mass spectra to classify whole-organism bacterial specimens. *Bioinformatics* **2004**, 20, 3128-3136.
301. Li, L., Umbach, D. M., Terry, P. I., Taylor, J. A.: Application of the GA/KNN method to SELDI proteomics data. *Bioinformatics* **2004**, 20, 1638-1640.
302. Lilien, R. H., Farid, H., Donald, B. R.: Probabilistic disease classification of expression-dependent proteomic data from mass spectrometry of human serum. *Journal of computational biology* **2003**, 10, 925-946.
303. Pakhira, M. K., Bandyopadhyay, S., Maulik, U.: Validity index for crisp and fuzzy clusters. *Pattern Recognition* **2004**, 37, 487-501.
304. Berry, M. W., Browne, M., Langville, A. N., Pauca, V. P., Plemmons, R. J.: Algorithms and applications for approximate nonnegative matrix factorization. *Computational Statistics & Data Analysis* **2007**, 52, 155-173.
305. Matlab Dokumentation. <https://de.mathworks.com/help/signal/ref/findpeaks.html>.

- 
306. Zhang, J., Zenobi, R.: Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39, 808-816.
307. Thurman, E. M., Ferrer, I.: The isotopic mass defect: a tool for limiting molecular formulas by accurate mass. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 397, 2807-2816.
308. Vorm, O., Roepstorff, P.: Detector bias gating for improved detector response and calibration in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, 31, 351-356.
309. Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J.: MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications. *John Wiley & Sons*, **2013**.
310. Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A., Mann, M.: Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. In *2-D proteome analysis protocols*, Springer, **1999**, pp 513-530.
311. Řehulka, P., Šalplachta, J., Chmेलík, J.: Improvement of quality of peptide mass spectra in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and post-source decay analysis of salty protein digests by using on-target washing. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38, 1267-1269.
312. Schwartz, S. A., Reyzer, M. L., Caprioli, R. M.: Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38, 699-708.
313. Shinohara, Y., Furukawa, J.-i., Niikura, K., Miura, N., Nishimura, S.-I.: Direct N-glycan profiling in the presence of tryptic peptides on MALDI-TOF by controlled ion enhancement and suppression upon glycan-selective derivatization. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 6989-6997.
314. Wang, M. Z., Fitzgerald, M. C.: A solid sample preparation method that reduces signal suppression effects in the MALDI analysis of peptides. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 625-631.
315. Kumaran, S., Abdelhamid, H. N., Wu, H.-F.: Quantification analysis of protein and mycelium contents upon inhibition of melanin for *Aspergillus niger*: a study of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *RSC Advances* **2017**, 7, 30289-30294.
316. Marsico, A. L. M., Duncan, B., Landis, R. F., Tonga, G. Y., Rotello, V. M., Vachet, R. W.: Enhanced laser desorption/ionization mass spectrometric detection of biomolecules using gold nanoparticles, matrix, and the coffee ring effect. *Analytical Chemistry* **2017**, 89, 3009-3014.
317. Feldman, R., Sanger, J.: The text mining handbook: advanced approaches in analyzing unstructured data. *Cambridge university press*, **2007**.
318. Deininger, S. O., Ebert, M. P., Futterer, A., Gerhard, M., Rocken, C.: MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. *Journal of Proteome Research* **2008**, 7, 5230-5236.
319. Weaver, E. M., Hummon, A. B., Keithley, R. B.: Chemometric analysis of MALDI mass spectrometric images of three-dimensional cell culture systems. *Analytical Methods* **2015**, 7, 7208-7219.
320. Jansen, J. J., Blanchet, L., Buydens, L. M. C., Bertrand, S., Wolfender, J.-L.: Projected Orthogonalized CHEmical Encounter MONitoring (POCHEMON) for microbial interactions in co-culture. *Metabolomics* **2014**, 11, 908-919.

321. Diehn, S., Zimmermann, B., Bağcıoğlu, M., Seifert, S., Kohler, A., Ohlson, M., Fjellheim, S., Weidner, S., Kneipp, J.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) shows adaptation of grass pollen composition. *Scientific Reports* **2018**, 8, 16591.

## 7.5 Publikationsverzeichnis

### 7.5.1 Veröffentlichungen

**F. Lauer**, S. Seifert, J. Kneipp, S. Weidner, "*Simplifying the preparation of pollen grains for MALDI-TOF MS classification*", *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 543.

(<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/543>)

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Seifert, J. Kneipp, V. Sauerland, C. Barahona, S. Weidner, "*Multivariate Analysis of MALDI Imaging Mass Spectrometry Data of Single Pollen Grain Mixtures*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2018**, 29 (11), 2237-2247.  
<https://doi.org/10.1007/s13361-018-2036-5>.

### 7.5.2 Vorträge

**F. Lauer**, "*Multivariate Analysis of MALDI Imaging Mass Spectrometry Data of Pollen Grains*", *Adlershofer Kolloquium Analytik I Intern*, Berlin, **Mai 2018**.

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Weidner, J. Kneipp, "*A graphical user interface for a fast multivariate classification of MALDI-TOF MS data of pollen grains*", 12. *Interdisziplinäres Doktorandenseminar des GDCh Arbeitskreises Prozessanalytik*, Berlin, **März 2018**.

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Multivariate MALDI-TOF MS imaging of artificial pollen grain mixtures*", *OurCon V – Mass Spectrometry Imaging Conference*, Doorn/Netherlands, **September 2017**.

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Artificial pollen grain mixtures analyzed with multivariate MALDI-TOF MS imaging*", *Anakon 2017*, Tübingen, **April 2017**.

**F. Lauer**, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Multivariate statistics applied to MALDI-TOF MS data of pollen samples*", 20. *MALDI-Kolloquium*, Berlin, **Mai 2016**.

### 7.5.3 Poster

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Seifert, J. Kneipp, V. Sauerland, C. Barahona, S. Weidner, "*Multivariate Analysis of MALDI Imaging Mass Spectrometry Data of Mixtures of Single Pollen Grains*", *66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Diego/USA, **Juni 2018**.

**F. Lauer**, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Multivariate identification of pollen grains in mixtures using MALDI-TOF MS imaging*", *BAM PhD Day*, Berlin, **Mai 2018**.

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Weidner, J. Kneipp, "*Identification of pollen grains in mixtures using hyperspectral MALDI-TOF MS imaging*", *FT-IR Workshop*, Berlin, **Oktober 2017**.

**F. Lauer**, S. Diehn, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Quantitative profiling of pollen grain mixtures by multivariate MALDI-TOF MS*", *Euroanalysis 2017*, Stockholm/Sweden, **September 2017**.

⇒ Ausgezeichnet durch die Royal Society of Chemistry (RSC) als beste Poster Präsentation (Pitch) des Tages.

**F. Lauer**, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Simplifying the preparation of pollen samples for MALDI-TOF MS classification*", *11. Interdisziplinäres Doktorandenseminar des GDCh Arbeitskreises Prozessanalytik*, Berlin, **März 2017**.

**F. Lauer**, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Artificial pollen grain mixtures analyzed with MALDI-TOF MS followed by multivariate statistics*", *BAM PhD Day*, Berlin, **September 2016**.

**F. Lauer**, S. Seifert, S. Weidner, J. Kneipp, "*Multivariate statistics applied to MALDI-TOF MS data of pollen samples*", *49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*, Hamburg, **März 2016**.

## Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

---

Berlin, den 27.11.2018

Franziska Lauer